

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

**METFORMĪNA EFEKTI UZ MIKROGLIOZI,  
HOLĪNERĢISKO NEIROTRANSMISIJU UN  
SINAPŠU BLĪVUMU PIE SPORĀDISKAS  
ALCHEIMERA SLIMĪBAS TIPA PATOLOĢIJAS**

MAĢISTRA DARBS

Autore: **Jeļizaveta Jeva Bulinska**

Studenta apliecības Nr.: jb15038

Darba vadītājs: Dr. med. Vladimirs Piļipenko

RĪGA 2020

## ANOTĀCIJA

Šajā pētījumā noteica perorāli ievadīta metformīna (75 mg/kg un 100 mg/kg devās) efektus uz vairākiem sporādiskās Alzheimerā slimības tipa modeļzūru smadzeņu procesiem: neuroiekaisumu, sinapšu blīvuma samazināšanos un acetilholīnesterāzes aktivitāti.

Pētījuma rezultāti parāda, ka abās devās metformīns spēj novērst mikrogliozu, sinaptiskā blīvuma samazināšanos un normalizēt acetilholīnesterāzes blīvumu modeļzūru smadzenēs.

Iegūtie dati norāda uz metformīna neiroprotektīvo potenciālu sporādiskās Alzheimerā slimības patoloģisko izmaiņu novēršanu. Nepieciešami tālākie pētījumi, lai uzzinātu visu metformīna neiroprotektīva potenciāla klāstu sAD-tipa modelī.

**Atslēgvārdi:** Alzheimerā slimība, acetilholīnesterāze, neuroiekaisums, metformīns, sinapses blīvums.

## ABSTRACT

In this study, the effects of peroral metformin at doses of 75 mg/kg and 100 mg/kg were assessed in sporadic Alzheimer's disease-type model-rats on the following processes: neuroinflammation, synaptic density and acetylcholine esterase activity.

Results of the study show that metformin at both doses were able to prevent microgliosis, decrease in synaptic density and elevated acetylcholinesterase density in the brain of model animals.

Obtained data indicate the neuroprotective potential of metformin in the prevention of pathological changes observed in the sporadic Alzheimer's disease. Further studies are required to discover the full neuroprotective potential of metformin in sAD-type model.

**Key words:** Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, neuroinflammation, metformin, synaptic density.

## APZĪMEJUMI

AChE – acetilholīnesterāze (*acetylcholinesterase*)

AD – Alcheimera slimība (*Alzheimer's disease*)

AHN – pieaugušo hipokampālā neuroģenēze (*adult hippocampal neurogenesis*)

AMPK – aktivizēta proteīnkināzes (*AMP activated protein kinase*)

*APOE4* – apolipoproteīna E4 gēns

APP – amiloīda prekursora proteīns

Aβ – amiloīda β peptīds

ChAT – holīna acetiltransferāze (*choline acetyltransferase*)

CNS – centrāla nervu sistēma

CA – *cornu ammonis*

DAB – 3,3 'diaminobenzidīns

DG – *dentate gyrus*

fAD – iedzimtā Alcheimera slimība (*familial Alzheimer's disease*)

FDG-PET – fluoro-D-glikozes pozitronu emisijas tomogrāfija

GLUT – glikozes transporteris

Iba-1 – jonizētā kalciju saistošā adaptera molekula-1 (*ionized calcium-binding adaptor molecule-1*)

MCI – vieglie kognitīvie traucējumi (*mild cognitive impairment*)

MT – mikrotubuļi

NFT – neirofibrilārie mezgli

NFκB – nukleārais faktors kappa B

PHF – sapāroti spirālveida pavedieni (*paired helical filaments*)

PP – proteīnu fosfatāzes (*protein phosphatases*)

sAD – sporādiskā Alcheimera slimība

SYP-1 – sinaptofizīns 1 (*synaptophysin-1*)

STZ – streptozocīns

# SATURS

ANOTĀCIJA.....	2
ABSTRACT.....	3
APZĪMEJUMI.....	4
IEVADS.....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	9
1.1. Alzheimer slimības epidemioloģija.....	9
1.2. Alzheimer slimības patoģenēze.....	10
1.2.1. Sinaptiskā plasticitāte.....	10
1.2.2. Sporādiskā Alzheimer slimības forma.....	11
1.2.3. Amiloīda beta teorija.....	11
1.2.4. Tau teorija.....	14
1.2.5. Tauopātiju ārstēšana.....	18
1.2.6. Metformīns.....	18
1.2.7. Glikozes hipometabolisma loma Alzheimer slimībā.....	21
1.2.8. Neuroiekaisuma loma Alzheimer slimībā.....	23
1.2.9. Smadzeņu neuroģenēze.....	26
1.2.10. Alzheimer slimības simptomi un riski.....	28
1.3. Alzheimer slimības terapija.....	30
1.4. Streptozocīna izmantošana Alzheimer slimības modelēšanai.....	31

2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	33
2.1. Izmantotie reaģenti un antivielas.....	33
2.2. Dzīvnieki.....	33
2.3. Eksperimenta dizains.....	33
2.4. Imūnhistoķīmiskā analīze.....	35
2.5. Histoķīmiskā analīze.....	35
2.6. Acetilholīna esterāzes aktivitātes novērtējums.....	36
2.7. Kvantitatīvā noteikšana.....	36
2.8. Statistiskā analīze.....	36
3. REZULTĀTI.....	37
3.1. Metformīna efekti uz mikrogliozi sAD un veselo žurku smadzenēs.....	37
3.2. Metformīna efekti uz sinaptisko blīvumu sAD un veselo žurku smadzenēs.....	38
3.3. Metformīna efekti uz AChE blīvumu sAD un veselo žurku smadzenēs.....	39
3.4. Metformīna efekti uz acetilholīnesterāzes aktivitāti <i>in vitro</i> .....	40
4. DISKUSIJA.....	41
5. SECINĀJUMI.....	43
PATEICĪBAS.....	44
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	45
DOKUMENTĀRĀ LAPA.....	54

## IEVADS

Alcheimera slimība (*Alzheimer's disease*, AD) ir progresējoša, multifaktoriāla neurodeģeneratīva smadzeņu slimība, kas noved pie neironu bojāejas, izraisot kognitīvos traucējumus. Bioenerģētiskie deficīti ir labi dokumentēti AD preklīniskajos modeļos, parādās agrīnā Alcheimera prodromālajā fāzē un tiem, kuriem ir AD risks. Darbības mehānismi pašreizējai AD mitohondriju un bioenerģētiskai terapijai plaši iedalās kategorijās: 1) glikozes metabolisms un substrāta apgāde; 2) mitohondriju pastiprinātāji enerģijas ražošanas palielināšanai; 3) antioksidanti reaktīvo skābekļa daudzumu iznīcināšanai un oksidatīvo bojājumu mazināšanai (Gibson *et al.*, 2010). Trīs raksturīgākas AD iezīmes ir amiloīda  $\beta$  peptīda (A $\beta$ ) ekstracelulāro plātnīšu izgulsnēšanās, hiperfosforilētā *tau* proteīna neurofibrilāro mezglu intracelulārā izgulsnēšanās, kā arī neuroiekaisums (Murphy *et al.*, 2010). Vecākā no AD patofizioloģisko mehānismu hipotēzēm ir amiloīda kaskādes teorija (Dorszewska *et al.*, 2016).

Katrs AD gadījums ir atšķirīgs. Vidēji cilvēki pēc 65 gadu vecuma izdzīvo četrus līdz astoņus gadus pēc AD diagnozes. Ir trīs AD stadijas: 1) preklīniskā AD stadija ilgst no 2 līdz 4 gadiem – pētījumi norāda, ka šajā posmā notiek smadzeņu izmaiņas, kas izsauc Alcheimera slimību un var sākties pat 20 gadus pirms simptomu parādīšanās; 2) viegls vai mērens izziņas kritums ilgst no 2 līdz 10 gadiem – problēmas atcerēties nesenos notikumus vai veikt matemātikas uzdevumus; 3) smags izziņas kritums ilgst no 1 gada līdz 3 gadiem – smadzenes vairs nespēj pateikt ķermenim, kas jādara, cilvēks pavada savu laiku gultā, nav spējīgs sevi aprūpēt. (Ellis *et al.*, 2016). Lielāko daļu laika (apmēram 40%) pavada smagākajā AD stadijā (Wegerer, 2018).

AD ir multifaktoriāla slimība, kuras cēloņi ir atkarīgi no ģenētikas (70%) un apkārtējās vides (30%) ietekmes. Starp ģenētiskajiem faktoriem ir gēni, kas saistīti ar slimības iedzimtās (*familial AD*, *fAD*) formas attīstību: amiloīda prekursora proteīns (APP), prezenilīns (PSEN)1 un PSEN2. Visstiprākais ģenētiskais faktors ir *apolipoproteīna E4 (APOE4)* gēns, kas ir iesaistīts arī sporādiskās (*sAD*) formas ģenēzē. Vairāk nekā 95% Alcheimera slimībai ir no sporādisko gadījumi, kuriem galvenie neģenētiskie riska faktori ir novecošanās un vielmaiņas traucējumi, kur saistītie dzīvnieku modeļi ir svarīgi pētījumu instrumenti patoģenēzes izpētei un jaunu zāļu izstrādē (Bao *et al.*, 2017).

Glikoze ir galvenais smadzeņu enerģijas substrāts, jo smadzenes patērē 25% no ķermeņa glikozes. Izmainīts glikozes smadzeņu metabolisms, noteikts ar pozitronu emisijas tomogrāfijas PET skenēšanu ar 18F-fluorodeoksiglikozes (18F-FDG-PET), ir pirmā izmaiņa

AD slimnieku smadzeņu rajonos. Epidemioloģiskie un patofizioloģiskie pētījumi parādīja saikni starp AD un diabētu, īpaši saistībā ar rezistenci pret insulīnu (Calsolaro *et al.*, 2016). Metformīns ir biguanīdu grupas savienojums, kuru vairāk nekā 60 gadus izmanto 2. tipa diabēta ārstēšanai. Cukura diabēta slimniekiem tas var palīdzēt kontrolēt cukura līmeni asinīs un jutīgumu pret insulīnu. Pierādīts, ka AD slimniekiem ir izmainīta jutība pret insulīnu. Daži pētījumi liecina, ka metformīns var samazināt Alcheimera risku, bet citi ir atklājuši, ka ilgstoša lietošana to var palielināt (Bodmer, 2012).

### **Darba mērķis:**

Noteikt metformīna 75 mg/kg un 100 mg/kg devu efektus uz neironālo plasticitāti un neuroiekaisumu, sAD-tipa netransgēnajā modeļa žurku smadzeņu struktūrās.

### **Darba uzdevumi:**

1. Imunohistoķīmiski noteikt metformīna efektus uz veselo un sAD modeļžurku ekspresiju smadzeņu garozas un hipokampa proteīniem, kas iesaistīti neuroiekaisumā (Iba-1), sinaptiskajā blīvumā (SYP-1) un acetilholīna šķelšanā (AChE).
2. *In vitro* noteikt metformīna ietekmi ar STZ izraisīta uz acetilholīnesterāzes (AChE) blīvumu un tās aktivitātes inhibēšanu.

Darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedras laboratorijā.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Alcheimera slimības epidemioloģija

AD ir raksturīga progresīva smadzeņu darbības pasliktināšanās, kas parasti sākas ar nesenas atmiņas veidošanās traucējumiem, bet neizbēgami ietekmē visas intelektuālās spējas un AD slimnieks paliek pilnīgi atkarīgs no apkārtējiem cilvēkiem ikdienas pamatfunkciju veikšanai. Alcheimera slimības patoloģiskajās izpausmēs ietilpst difūzās un neirofibrilārās ārpusšūnu A $\beta$  plātnītes un intracelulārie neirofibrilārie mezgli, ko pavada reaktīva mikroglia, distrofiski neirīti un neironu un sinapses zudumi (Mayeux *et al.*, 2012). Alcheimera slimība pirmo reizi tika identificēta pirms vairāk nekā 100 gadiem, taču tās simptomu, cēloņu, riska faktoru un ārstēšanas pētījumi ir guvuši impulsu tikai pēdējos 30 gados (Xu *et al.*, 2013).

Balstoties uz pieejamajiem epidemioloģiskajiem datiem, ekspertu grupa uzskata, ka mūsdienās ir 24,3 miljoni cilvēku ar demenci, un katru gadu ir 4,6 miljoni jaunu demences gadījumu (Xu *et al.*, 2013). Alcheimera slimība ir biežākais demences cēlonis Rietumu sabiedrībā. Ir paredzams, ka biežums divkārsosies ik pēc 20 gadiem līdz 2040. gadam. Gaidāmā pieauguma apmērs, kas saistīts ar sabiedrības novecošanos, ir ievērojams un turpmākajos gados būs dārgs slogs sabiedrības veselībai (Mayeux *et al.*, 2012).

Lielākā daļa cilvēku ar demenci dzīvo jaunattīstītajās valstīs. Ķīnā un tās Klusā okeāna rietumu kaimiņos ir visvairāk cilvēku ar demenci (6 miljoni), kam seko Eiropas Savienība (5 miljoni), ASV (2,9 miljoni), Indijā (1,5 miljoni). Demences gadījumu skaita pieauguma tempi visā pasaulē nav vienādi. Tiek prognozēts, ka skaits attīstītajās valstīs no 2001. gada līdz 2040. gadam palielināsies par 100%, bet Indijā, Ķīnā un citās Dienvidāzijas un Klusā okeāna rietumu valstīs palielināsies par vairāk nekā 300%. Apmēram 70% šo gadījumu tika attiecināti uz Alcheimera slimību. Apkopotie dati par Eiropā veiktajiem pētījumiem, kas balstīti uz populāciju, liecina, ka vecuma standartizētā izplatība cilvēkiem no 65 gadu vecuma bija 6,4% demences gadījumā un 4,4% Alcheimera slimības gadījumā. ASV veiktā reprezentatīva parauga pētījumā, kurā piedalījās cilvēki, kas vecāki par 70 gadiem, Alcheimera slimības izplatība bija 9,7% (Xu *et al.*, 2013).

Analizējot datus pēc Slimību profilakses un kontroles centra datiem, Latvijā 2017. gadā demenci pirmoreiz konstatēja 1108 iedzīvotājiem, kopumā reģistrā ar diagnosticētu demenci 2017. gada beigās bija 5469 iedzīvotāji. 8 gadu laika periodā demences pacientu skaits uz 100

000 iedzīvotājiem bija 282,7 slimnieku. Salīdzinot no 2009. – 2017. gadam demences pacientu skaits palielinās (Slimību profilakses un kontroles centrs, 2017).

Sievietēm ir divreiz lielāks depresijas risks nekā vīriešiem. Depresija ietekmē izziņu visa mūža garumā, jo garstāvoklis un atmiņa sakrīt ar tiem pašiem smadzeņu reģioniem. Pētījumos tiek ziņots, ka depresija ir AD riska faktors, piemēram, AD saslimšanas risks palielinās par 70% cilvēkiem, kuriem bija novērota pusmūža depresija. Sakarā ar to, ka sievietes vairāk pakļautas depresijai, saslimt ar AD risks ir augstāks sievietēm nekā vīriešiem (Mielke, 2018).

Veseliem, gados vecākiem cilvēkiem A $\beta$  līmenis paaugstinās. *Tau* sieviešu smadzenēs salīdzinājumā ar vīriešu smadzenēm ir smalkāks. Iepriekšējie pētījumi ir pierādījuši augstāku AD saslimšanas biežumu sievietēm, kā arī ātrāku sieviešu kognitīvās aktivitātes samazināšanos salīdzinājumā ar vīriešiem. No 5,5 miljoniem amerikāņu, kas ir virs 65 gadu vecuma ar AD, 3,4 miljoni ir sievietes. Sievietei pēc 60 gadu vecuma ir divreiz lielāka iespēja saslimt ar AD nekā ar krūts vēzi. Amerikāņiem, kas ir vecāki par 71 gadu, 16% sieviešu ir AD vai demence, savukārt vīriešiem 11%.

Pētījumi rāda, ka *APOE4* ir riska faktors lielāks sievietēm nekā vīriešiem. Sievietēm ar *APOE4* ir izteiktāka smadzeņu patoloģija nekā vīriešiem, t.i. ar vairāk izteiktiem AD simptomiem un ar vairāku lipīgo plāksnīšu uzkrāšanos (Sukel, 2018).

## 1.2. Alcheimera slimības patoģenēze

### 1.2.1. Sinaptiskā plasticitāte

Neironālā plasticitāte ir process, kas nosaka neironu šūnu aktivitāti un atbildi uz ievainojumiem un ietver aksonu, dendrītu un sinapšu strukturālo un funkcionālo procesu modulāciju. Plasticitāti veidojošo strukturālo elementu klāstā ietilpst ilgtermiņa potencēšana (iemācīšanās un atmiņas korelācija), sinaptiskā efektivitāte un pārveidošana, sinaptoģenēze, aksonu dīgšana un dendrītu pārveidošana, kā arī neiroģenēze un vervēšana.

Cilvēka smadzeņu deģeneratīvās slimības joprojām ir viena no biomedicīnas vissarežģītākajām problēmām. Piemēram, no novecošanās atkarīgus neurodeģeneratīvos traucējumus AD, ko neiropatoloģiskā līmenī raksturo nešķīstoša A $\beta$  nogulsnes ārpusšūnu plāksnēs un agregēts *tau* proteīns, kas galvenokārt atrodams intracelulāros neurofibrilāros jucekļos. Viegļās kognitīvās funkcijas traucējumus AD agrīnā stadijā var izraisīt sinaptiskās disfunkcijas, ko izraisa nefibrilārā oligomēriskā A $\beta$  uzkrāšanās, kas notiek krietni pirms

acīmredzamiem plaši izplatītiem sinaptiskajiem zaudējumiem un neurodeģenerācijas. Šķīstošie A $\beta$  oligomēri ārkārtīgi zemās koncentrācijās var nelabvēlīgi ietekmēt sinaptisko struktūru un plastiskumu, kaut arī molekulārie substrāti, ar kuriem tiek izjaukti sinaptiskās atmiņas mehānismi. Dendrītiskā mugurkaula ir primārā ierosinošās sinaptiskās transmisijas vieta zīdītāju centrālajā nervu sistēmā. Šīs struktūras, kas izvirzītas no dendrītiskām vārpstām, piedzīvo dinamiskas skaita, lieluma un formas izmaiņas, reaģējot uz hormonālā stāvokļa, attīstības pakāpes un aferento ieejas izmaiņām (Skaper *et al.*, 2017).

### 1.2.2. Sporādiskā Alcheimera slimības forma

AD raksturo toksisku proteīnu agregātu vai plāksnīšu klātbūtni, kas sastāv no A $\beta$  peptīda. APP proteolītiskās šķelšanās rada dažāda garuma A $\beta$  peptīdu. Daudzu ar ģimeni saistītu AD gēnu mutācijas ietekmē garāka A $\beta$ 42 varianta veidošanos, kas galvenokārt uzkrājas plāksnēs (Bali *et al.*, 2012).

Pastāv divas galvenās slimības formas: agrīna (ģimenes) un vēlīna (sporādiska). Agrīnā AD forma ir reti sastopama, un tas sastāda mazāk nekā 5% no saslimšanas gadījumiem. Tā ir iedzimta “Mendelian” dominējošā veidā, un to izraisa trīs gēnu (*APP*, *PSEN1* un *PSEN2*) mutācijas (Barber, 2012). Sporādiskā AD gadījumā, kas veido vairāk nekā 95% gadījumus, kur *APOE* gēns ir atbildīgs par sporādisku slimības formu. Citi molekulārie faktori, kas saistīti ar slimības imunoloģiskiem cēloņiem (*TREM2*), ir lipīdu (*ABCA1*, *ABCA7*) vai biotolu metabolisma un metabolītu transportēšanas traucējumi. Pašlaik tiek uzskatīts, ka *APOE4* ir gan sporādiskas, gan agrīnas formas riska faktors. AD patomehānismu visbiežāk izskaidro kā balstītu uz amiloīdo kaskādes teoriju. Šī teorija ir saistīta ar agrīnu formu, lai gan ir ziņojumi, kas norāda uz tās rašanās varbūtību uz sporādisku formu (Dorszewska *et al.*, 2016). Šīs slimības formas pārmantojamība ir augsta, bet etioloģiju nosaka ģenētisko un vides faktoru kombinācija. Liels gēnu skaits ir iesaistīts AD sākuma stadijā (Barber, 2012).

Tomēr atšķirībā no gēniem, kas ir agrīnās formas AD pamatā, sporādiskās AD formas gēnu jutību īpaši nemaina A $\beta$ 42/40 attiecībā un liek domāt, ka šie gēni, iespējams, veicina AD ar atšķirīgu mehānisma palīdzību (Bali *et al.*, 2012).

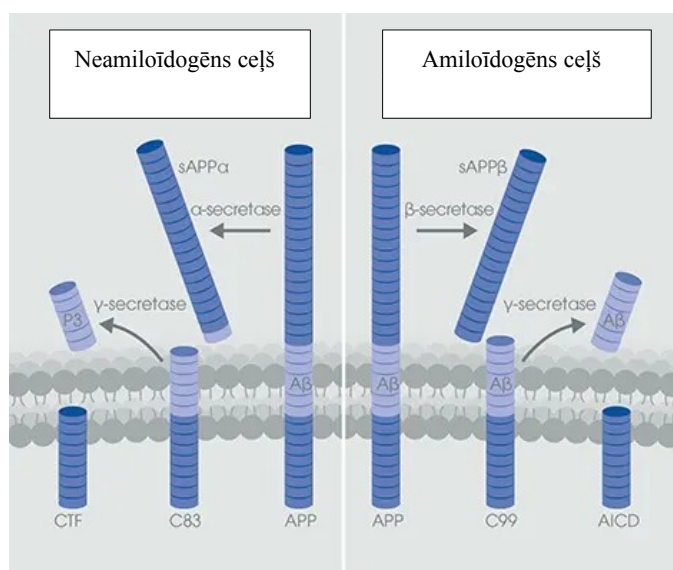
### 1.2.3. Amiloīda beta teorija

AD galvenās iezīmes ietver ievērojamas izmaiņas gan smadzeņu histoloģijā, gan uzvedībā. AD smadzenes mikroskopiski raksturo 2 klasēs esošo patoloģisko struktūru, ārpusšūnu A $\beta$  plātnīšu un intraneironālo neurofibrilāro jucekļu apvienojums, kas abi satur

nešķīstošus, blīvi iesaiņotus pavedienus. Šo struktūru šķīstošie celtniecības bloki ir A $\beta$  peptīdu un *tau* mezgliem.

A $\beta$  peptīdi ir transmembrānālā amiloīda prekursora proteolītiski fragmenti, turpretī *tau* ir smadzenēm specifisks, ar aksoniem bagātināts mikrotubuļu saistīts proteīns. AD uzvedības simptomi korelē ar plāksnīšu un jucekļu uzkrāšanos, kas pastarpina atmiņas bojājumus un izziņas traucējumus. Sinapses zudumu var izraisīt dzīvo neironu nespēja uzturēt funkcionālos aksonus un dendrītus vai neironu nāve, piemēram, akūtu neironu nāvi, aizkavētu neironu nāvi. Sinaptiskās disfunkcijas izraisa šķīstošas, ārpusšūnu A $\beta$  veidi, un tās ir atkarīgas no šķīstošās, citoplazmatiskās *tau*. Tāpēc AD ir patoģenēzes augšpus *tau* un izraisa *tau* pārvēršanu normālā stāvoklī vai toksiskā stāvoklī, bet ir arī pierādījumi, ka toksiskais *tau* palielina A $\beta$  toksicitāti, izmantojot atgriezeniskās saites cilpu. Tā kā gan A $\beta$ , gan *tau* šķīstošie toksiskie agregāti var izplatīties smadzenēs ar prionveidīgiem mehānismiem (Bloom, 2014).

A $\beta$  veidojas no proteīna, ko sauc par APP. A $\beta$  peptīdi tiek ražoti no APP proteolītiskās šķelšanas rezultātā ar enzīmu kompleksus  $\alpha$ ,  $\beta$  un  $\gamma$ -sekretāzes. Kad APP ir aktivizēta, lai veiktu parasto darbu, to sagriež citas proteīnu atsevišķās, mazākās sekcijās, kas paliek šūnās un ārpus tām. Tur ir vairāki dažādi veidi, kā APP var samazināties; dažos gadījumos viens no gabaliem ražotais ir A $\beta$  (Gao *et al.*, 2018).



1.2.3.1. attēls. **Neamiloīdogēna un amiloīdogēna APP apstrādes ceļi** (Allinson *et al.*, 2003)

APP šķelšanās notiek pa diviem atšķirīgiem ceļiem. Neamiloīdogēns ceļš nodrošina labvēlīgu neirotrofisku iedarbību, un amiloīdogēns ceļš rada neirotoksiskus A $\beta$  peptīdus. Abi

peptīdi, kas veidojas amiloīdogēnā ceļā, var nepareizi saliekties un sakopoties, veidojot nogulsnes, kas veicina AD patoloģiju (Allinson *et al.*, 2003).

Neamiloīdogēns ceļš ietver APP šķelšanu ar  $\alpha$ -sekretāzi, lai iegūtu divus fragmentus; 83 aminoskābes C-gala fragments (C83), kas paliek membrānā, un N-gala ektodomēns (sAPP $\alpha$ ), kas izdalās ārpusšūnu vidē. Ar  $\alpha$ -sekretāzes aktivitāti ir identificēti trīs enzīmi: ADAM9, ADAM10 un ADAM17. Svarīgi, ka APP šķelšana ar  $\alpha$ -sekretāzi notiek A $\beta$  domēnā, un līdz ar to tiek aizliegta A $\beta$  peptīda ražošana. Jāatzīmē, ka C83 membrānas fragmentu pēc tam var sašķelt ar  $\gamma$ -sekretāzi, lai iegūtu īsu fragmentu, ko sauc par P3 peptīdu, un C termināla fragmentu (CTF). Līdz šim tiek uzskatīts, ka P3 peptīds ir patoloģiski mazsvarīgs (Haas *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2010).

Amiloīdogēns ceļš noved pie neirotoksiska A $\beta$  veidošanās.  $\beta$ -sekretāze (BACE1) ir starpnieks pirmajā proteolīzes posmā, kas ārpusšūnu vidē atbrīvo lielu N-termināla ektodomēnu (sAPP $\beta$ ). Membrānā paliek 99 aminoskābju C termināla fragments (C99). Tikko atklātais C99 N-gals atbilst pirmajai A $\beta$  aminoskābei. Šī fragmenta secīga šķelšana ar  $\gamma$ -sekretāzi (starp 38. un 43. atlikumu) atbrīvo AP peptīdu.  $\gamma$ -sekretāze ir enzīmu komplekss, kas sastāv no *PSEN1* vai *PSEN2*, nikastrīna, un prezenilīna pastiprinātāja 2. Lielākajai daļai A $\beta$  peptīdu ir 40 atlikumu garums (A $\beta$  1–40), nelielā skaitā tie satur 42 atlikumus (A $\beta$  1–42). Ap 1–42 tiek uzskatīta par neirotoksiskāku formu, jo papildu divas aminoskābes nodrošina lielāku tendenci nepareizi saliekties un pēc tam savienoties. Paaugstināts A $\beta$  1-42 līmenis plazmā ir korelēts ar Alcheimera slimību (Haas *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2010).

A $\beta$  ir ķīmiski lipīgāks nekā citi fragmenti, kas ražoti, kad ir APP sagriezta. Tas pakāpeniski uzkrājas mikroskopiskās A $\beta$  plāksnēs, kuras tiek uzskatītas par AD skarto smadzeņu pazīmi. Gabali vispirms veido mazas kopas, ko sauc par oligomēriem, pēc tam klasteru ķēdes, ko sauc par fibrilām, pēc tam no fibrilām par beta lapas. Pēdējais posms ir plātnītes, kurās ir saliktas beta lapas un citas vielas.

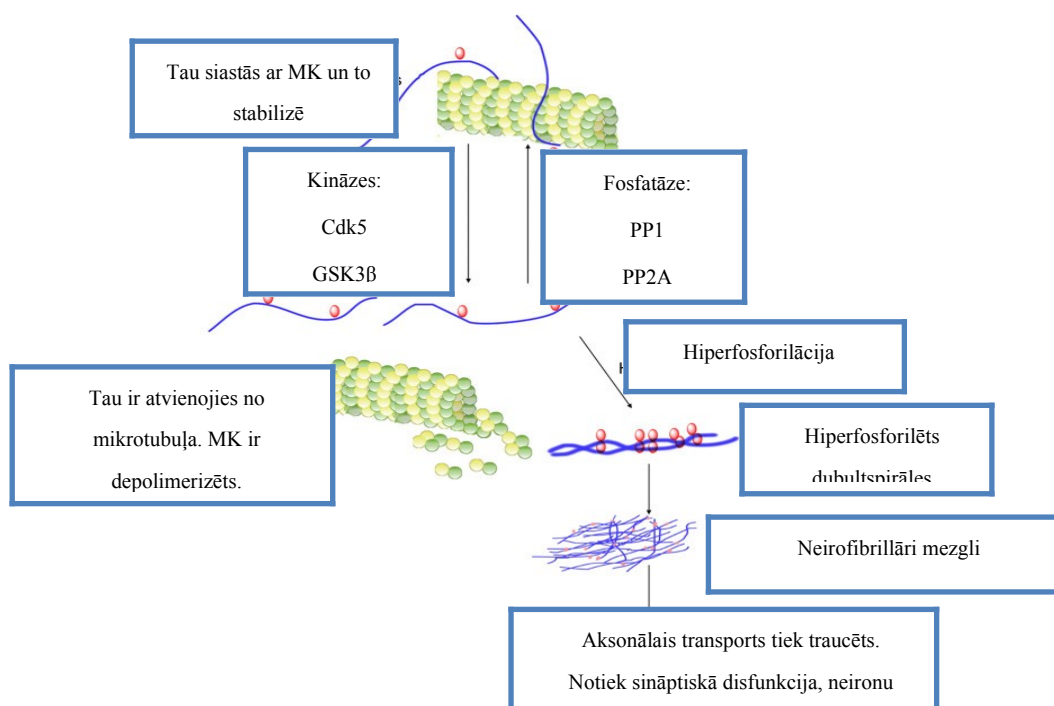
Saskaņā ar amiloīdo hipotēzi šie A $\beta$  agregācijas posmi izjauc šūnu savstarpējo saziņu un aktivizē imūnas šūnas. Šīs imūnās šūnas var izraisīt iekaisumu. Galu galā smadzeņu šūnas tiek iznīcinātas. Mutācijas notiek jebkurā no trim gēniem. Katrs no šiem gēniem ir iesaistīts bioloģiskos procesos, kas saistīti ar A $\beta$  veidošanos vai uzkrāšanos. Tikai aptuveni 1% cilvēku ar AD ir viena no šīm mutācijām. Zinātnieki ir izpētījuši peles, kas ir ģenētiski modificētas, lai pārnēsātu dažus no tiem ģenētiskām mutācijām. Pelēm veidojas A $\beta$  plātnītes, tām ir grūtības atcerēties savu ceļu caur labirintiem un attīstās citi simptomi, kas imitē cilvēka AD. Personas ar Dauna sindromu, kurām ir trīs hromosomas kopijas gandrīz vienmēr pārnēsā *APP*

gēnu, nevis parasto A $\beta$  plātnītes pēc 40 gadu vecuma. Ne visiem cilvēkiem ar Dauna sindromu attīstās AD, bet pētījumi liecina, ka apmēram 75% no cilvēkiem virs 65 gadu vecuma ir AD (Alzheimer's association, 2017).

Vairāki eksperimenti norāda, ka A $\beta$  veidošanās tiek uzskatīta par *tau* patoloģijas ierosinātāju vai pat tās virzītāju, neskatoties uz to, ka tā veidojas pēc *tau* nogulsņiem. Neironos, kas bija akūti pakļauti A $\beta$ , tie ierosināja *tau* izraisītu neirotoksicitāti, atvieglojot *tau* fosforilēšanu un novirzot patogēnās *tau* sugas dendrītos mugurkaulu smadzenēs, izraisot mugurkaula smadzeņu sabrukšanu un dendrītisku deģenerāciju. Pierādījumi liecina, ka *tau* proteīns ir būtiska A $\beta$  izraisītajai neirotoksicitātei. *Tau* samazināšana varētu efektīvi aizsargāt smadzenes pret A $\beta$ , kavējot neironu pārmērīgu ierosmi, ekscitotoksicitāti, atmiņas deficītu un priekšlaicīgu mirstību. Saskaņā ar pierādījumiem tiek ierosināts, ka *tau* var būt starpnieks A $\beta$  toksicitātē, modulējot tirozīnkināzi (Fyn), kas nodrošina saikni starp A $\beta$  un *tau* (Gao *et al.*, 2018).

### 1.2.4. Tau teorija

*Tau* ir mazs un šķīstošs proteīns, kas saistīts ar vairākām smadzeņu slimībām. Starp *tau* daudzveidīgajām funkcijām – uzturēt veselīgas smadzeņu šūnās, kur ļoti svarīga ir iekšējo mikrotubulu stabilizācija, kuras šūnas izmanto barības vielu un citu svarīgu vielu izplatīšanai no vienas nervu šūnas (neirona) daļas uz otru (Ellison, 2019).



1.2.4.1. attēls. *Tau* mediēta neurodeģenerācija (Dong *et al.*, 2012)

Fizioloģiski *tau* proteīns var saistīties un tādējādi stabilizēt mikrotubuļus (MT). *Tau* piesaistīšanās ar MT nosaka tā fosforilēšanās līmenis. Kināzes (Cdk5, GSK3β, MARK un ERK2) starpniecības *tau* fosforilēšana var izraisīt *tau* atdalīšanos no MT un tādējādi izraisīt MT depolimerizāciju. Pretēji, fosfatāze (PP1, PP2A, PP2B un PP2C) samazinās *tau* fosforilēšanās līmenis un atjaunos *tau* saistīšanās spēju MT. Šāds līdzsvars starp kināžu un fosfatāžu lomām tiek izjaukts patoloģiskā stāvoklī, un kināzes aktivitātes palielināšanās un fosfatāzes aktivitātes samazināšanās izraisīs *tau* hiperfosforēšanos. Hiperfosforilēts *tau* proteīns ir nepareizi salocīts un veido β-loksnes saturošas struktūras pāra spirālveida pavedienus (PHF). Šīs struktūras pārejas novedīs pie organizētākiem agregātiem un galu galā neironos attīstās neirofibrilārie mezgli (NFT). NFT pasliktinās normālu aksonālo transportu, izjauks sinaptisko plastiskumu un visbeidzot izraisīs šūnu zudumu (Dong *et al.*, 2012).

Tomēr tas ir arī daudzfunkcionāls proteīns ar kritisku lomu noteiktos neurodeģeneratīvos traucējumos, ieskaitot AD. *Tau* proteīni labi šķīst, izteiktas neironos, oligodendrocītos un astrocītos centrālajā nervu sistēmā (CNS) un perifērajā nervu sistēmā. Tas galvenokārt atrodams aksonos, kur tas regulē mikrotubulu polimerizāciju un stabilizāciju. Tomēr tā plašā saistošo partneru izvēle liek domāt, ka tai ir vairākas funkcijas, ieskaitot smadzeņu nobriešanu pēcdzemdību laikā, aksonu transporta un signālu kaskādes regulēšanu, šūnu reakciju uz karstuma šoku un pieaugušo neuroģenēzi (Bellatore *et al.*, 2007).

AD ir labi pazīstama ar neirofibrilāriem mezgliem, kas sastāv no modificēta *tau* proteīna. Dažas citas nopietnas smadzeņu slimības, kas saistītas ar patoloģisku *tau* proteīnu daudzumu, ir hroniska traumatiska encefalopātija, Pika slimība, frontotemporāla demence ar parkinsonismu-17 (FTDP-17), progresējoša supranukleārā paralīze (PSP) un kortikobasālā deģenerācija (CBD). Lai arī katra no šīm demences formām ir atšķirīga, tās visas ir smagas un progresējošas (Ellison, 2019).

Ir daudz pierādījumu, kas liecina, ka Aβ un *tau* ir galvenā loma slimības norisē. Viņi varētu arī ietekmēt un regulēt viens otra toksisko iedarbību (Ellison, 2019).

Zinātnieki jau sen ir norādījuši uz *tau* nozīmi AD, jo pierādījumi saista *tau* izplatību ar slimības progresēšanu. Aβ uzkrāšanās smadzenēs cilvēkam ar AD lielākoties ir pabeigta agrākā klīniskajā stadijā, kas pazīstama kā viegli neirokognitīvie traucējumi. Tomēr *tau* uzkrāšanās turpinās visā slimības gaitā. Sākot smadzeņu daļās, ko sauc par entorinālo garozu un hipokampu, smadzeņu *tau* turpina uzkrāties, progresējot AD. Jaunākie pierādījumi liecina, ka *tau* izplatās smadzenēs ar oligomēru “sēkliņu” palīdzību, kas pārvietojas pa struktūru, ko sauc par sinapsēm, kas ļauj nervu šūnai nodot elektrisko vai ķīmisko signālu citai nervu šūnai.

Kopējais patoloģiskā tau daudzums AD smadzenēs ir saistīts ar slimības stadiju un smagumu (Ellison, 2019).

*Tau* kā sākotnēji izlocītam proteīnam ir maz tendences uz agregāciju struktūrā. Pierādījumi ir atklājuši, ka *tau* molekulā varētu būt nosliece uz konformācijas izmaiņām, veidojot saspraudei līdzīgu struktūru N-gala, C-gala un MBD klātbūtnē. Saspraudei līdzīga forma var novērst *tau* veidošanos. Kad šī struktūra ir sabojāta, piemēram, hiperfosforilējoties, šie *tau* molekulas inhibējošie domēni tiks neitralizēti un pēc tam *tau* proteīni pats samontēsies PHF jucekļos. *Tau* apkopošanu var ietekmēt posttranslācijas modifikācijas. Jo īpaši tiek pieņemts, ka fosforilēšana kā AD raksturīga iezīme veicina *tau* agregāciju. Citas posttranslācijas modifikācijas parāda arī kavējošu vai veicinošu efektu uz *tau* agregāciju, ieskaitot O-GlcNAcilāciju, deamidāciju, izomerizāciju, metilēšanu (Gao *et al.*, 2018).

Parasti *tau* fizioloģisko funkciju realizēšanai ir nepieciešams atbilstošs fosforilēšanās daudzums, turpretī hiperfosforilēts stāvoklis samazina tā bioloģisko aktivitāti (Gao *et al.*, 2018).

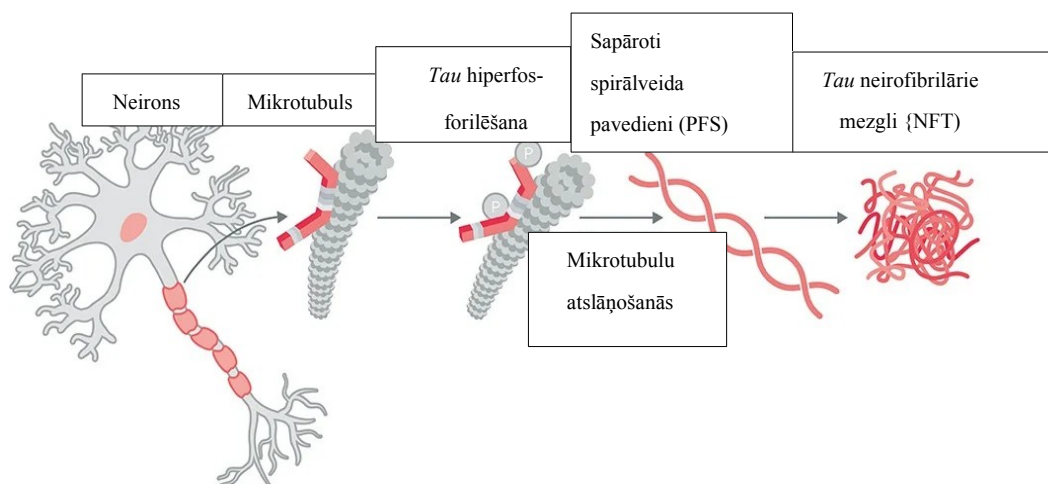
*Tau* proteīnu fosforilēšanās stāvokli galvenokārt modulē dažādas proteīnu kināzes un fosfatāzes. *Tau* fosforilē vairākas proteīnu kināzes, kuras iedala trīs grupās, ieskaitot prolīnam vērstās proteīnu kināzes un tirozīnkināzes. Konstatēts, ka AD pacientu smadzenēs bija vairākas šo kināžu kombinācijas, kas nozīmē, ka viņi varētu būt iesaistīti *tau* fosforilēšanā. Bez tam *tau* proteīnu var fosforilēt arī tirozīnkināzes, ieskaitot *Src ģimenes kināzes* (SFK), FYN un ABL ģimenes kināzes. Vēl vairāk, *tau* hiperfosforilēšanos var izraisīt arī fosfatāžu, tai skaitā proteīnu fosfatāzes1 (PP1, PP2A, PP2B, PP2C un PP5) nomākšana, starp kurām PP2A ir galvenā fosfatāze un veido vairāk nekā 70% no *tau* fosfatāzes aktivitāte cilvēka smadzenēs. PP2A tieši regulē *tau* fosforilēšanu vai, regulējot vairāku *tau* proteīna kināžu aktivitāti. Tika novērots, ka PP2A aktivitāte ir samazinājusies par 50% AD slimnieku smadzenēs (Gao *et al.*, 2018).

Eksperimentālie pētījumi rāda, ka *tau* agregācija ir būtiska tau izraisītajai toksicitātei. *Tau* agregācija var samazināt šķīstošā funkcionālā *tau* līmeni, atdalīt citus šūnu komponentus vai kavēt aksonālo transportu, galu galā izraisot neurodeģenerāciju (Gao *et al.*, 2018).

*Tau* var iedalīt četros reģionos: N-terminālajā reģionā, ar prolīniem bagātajā domēnā, mikrotubulus saistošajā domēnā un C-terminālajā reģionā. Cilvēka *tau* gēns – ar mikrotubuliem saistīts proteīns *tau*, satur 16 eksonus un alternatīvus 2., 3. un 10. eksona savienošana rada sešas izoformas, kurš izstrāda instrukcijas proteīnu sasniegšanai, šis proteīns atrodas visā nervu sistēmā, ka arī nervu šūnās (neironos) smadzenēs. Tās ir iesaistīts

mikrotubuļu, veido šūnas struktūru – citoskeletu. Mikrotubulas palīdz šūnām saglabāt savu formu, palīdz šūnu dalīšanās procesā un transportēšanā. *Tau* proteīni satur 85 potenciālos serīna, treonīna un tirozīna fosforilēšanās vietas, un normālos apstākļos fosforilēšana palīdz saglabāt citoskeleta struktūru. Ir zināms, ka tau nenormāla fosforilēšanās veicina AD, slimības patoloģija, ar AD smadzenēm identificētas aptuveni 45 specifiskas fosforilēšanās vietas. *Tau* tiek pakļauts vairākām post-translācijas modifikācijām papildus fosforilēšanai, ieskaitot glikolizēšanu, glikāciju, saīsināšanu, nitrēšanu, oksidēšanu, poliaminēšanu un agregāciju (Martin *et al.*, 2011; Noble *et al.*, 2013).

Plāksnīšu un intracelulāru NFT uzkrāšanās ir saistīta ar AD simptomiem un izraisa neironu bojājumus un nāvi. Tagad tiek uzskatīts, ka šķīstošie A $\beta$  un *tau* darbojas tandēmā, neatkarīgi no to uzkrāšanās plāksnēs un jucekļos, lai virzītu neironus uz slimu stāvokli.



#### 1.2.4.2. attēls. Neurofibrilāru mezglu veidošanās ar *tau* proteīnu palīdzību tādās tauopātījās kā AD (Haas *et al.*, 2010).

Patoloģiskos apstākļos *tau* kļūst hiperfosforilēta un atdalās no MT. Pēc tam fosforilēts *tau* agregāts, veidojot sapārotus spirālveida pavedienus (PHF) un NFT (Haas *et al.*, 2010).

AD gadījumā intracelulārā šķīstošā A $\beta$  līmeņa paaugstināšanās noved pie *tau* patoloģiskas fosforilēšanās un tā atbrīvošanās no MT šķīstošā monomēra formā. Reagējot uz A $\beta$ , *tau* tiek pārvietots no aksoniem uz neironu somatodendrītiskajiem nodalījumiem. Šeit *tau* var saistīt un atdalīt Src tirozīnkināzi, fyn, mainot tā lokalizāciju. Paaugstināts fyn līmenis pavada paaugstinātu *tau* līmeni dendrītiskajos mugurkaulos, ļaujot fosforilēt un stabilizēt uzbudinošos GluN2B NMDA receptorus. Tas uzlabo glutamāta signālu pārraidi un izraisa intracelulāro Ca<sup>2+</sup>ieplūdi, kas pastiprina A $\beta$  toksicitāti. Kalcija izraisīta eksitotoksicitāte var sabojāt post-sinaptiskās vietas un izraisīt mitohondriju Ca<sup>2+</sup>pārslodzi, membrānas

depolarizāciju, oksidatīvo stresu un šūnu apoptozi. Ekstracelulārie pūslīši var būt iesaistīti patoloģiskā Aβ un tau izplatīšanā AD mēru un NFT prionveidīgajā izplatībā (Vingdeux *et al.*, 2012). Jaunās terapeitiskās stratēģijas AD ārstēšanā var ietvert Aβ izraisītas, no tau atkarīgs NMDA receptoru aktivitātes pastiprināšanas novēršanu, samazinot fyn19 dendrītu līmeni vai tieši mērķējot uz tau (Murray *et al.*, 2015).

### 1.2.5. Tauopātiju ārstēšana

Antisense oligonukleotīdu, kas vērsta pret mutācijas izdzīvošanas motora neironu 1. gēnu (SMN1) mugurkaula muskuļu atrofijas ārstēšanai, kam raksturīgas apakšējo motoro neironu izmaiņas. Smadzeņu traumas pētījumos ar pelēm, kuras ārstēja ar antivielām, kas vērstas pret fosfo-tau (*p-tau*), tika ziņots, ka tās apturēja tau oligomēru un kompleksu veidošanos, neļāva kaitīgam tau izplatīties kaimiņu šūnās, samazināja smadzeņu atrofiju un atguva ilgstošu potenciālu (Arendt *et al.*, 2016; Bezdard *et al.*, 2013).

Ir ziņots, ka metformīns, kas nomāc aknu glikozes ražošanu neironu šūnu modelī ar rezistenci pret insulīnu, novērš tau fosforilēšanos (Sarazin *et al.*, 2003). Pētījumos ar tau transgēniem ziņots par patoloģiskas tau fosforilēšanās samazināšanos, kā arī ar tau šķelšanās, agregācijas, sinaptisko sabrukumu un pakaļējo ekstremitāšu atrofijas palielināšanos (Maccioni *et al.*, 2009).

### 1.2.6. Metformīns

Metformīns (METF) ir antihyperglikēmiskais biguanīdu grupas līdzeklis, ko izmanto 2. tipa cukura diabēta ārstēšanai. METF tiek uzskatīts par antihyperglikēmisku līdzekli, jo tas pazemina glikozes koncentrāciju asinīs 2. tipa diabēta gadījumā, neizraisot hipoglikēmiju. METF parasti tiek aprakstīts kā sensibilizators pret insulīnu, izraisot insulīna rezistences samazināšanos un klīniski nozīmīgu insulīna līmeņa samazināšanu plazmā tukšā dūšā. Pacientiem, kuriem diagnosticēts 2. tipa cukura diabēts, insulīns vairs nerada pietiekamu iedarbību uz audiem un šūnām (insulīna rezistence), kā arī var būt arī insulīna deficīts. METF samazina glikozes ražošanu aknās, samazina glikozes uzsūkšanos zarnās un paaugstina jutību pret insulīnu, palielinot gan perifēro glikozes uzņemšanu, gan izdalīšanos (DrugBank, 2020). METF labvēlīgās darbības ir atklātas pat ārpus diabēta ārstēšanas, un to uzskata par vienu no daudzsoļīgākajām zālēm, kas potenciāli varētu palēnināt novecošanos. METF ietekme uz smadzeņu darbību un metabolismu nav daudz pētīta, ņemot vērā, ka smadzenes izmanto glikozi kā enerģijas metabolisma substrātu. Pētīja METF ietekmi uz lokomotorām un

kognitīvajām funkcijām uz pelēm ar normoglikēmisku stāvokli. METF uzlaboja lokomotoros un līdzsvara rādītājus, vienlaikus hroniskas ārstēšanas laikā izraisot anksiolītisku efektu un traucējot kognitīvās funkcijas. Veica *in vitro* testus un metabolisma analīzes pelēm, lai novērtētu METF iedarbību uz smadzeņu metabolismu. METF samazināja ATP līmeni un aktivizēja AMP-aktivētu proteīnu kināzes (AMPK) ceļu peļu hipokampā. METF inhibēja oksidatīvo fosforilēšanos un paaugstinātu glikolīzi, inhibējot mitohondriju glicerīna-3-fosfāta dehidrogenāzi (mGPDH) *in vitro* terapeitiskās devās. Secinot, pētījums pierādīja, ka METF terapija ietekmē smadzeņu bioenerģētiku ar kombinētu iedarbību uz lokomotoru un kognitīvo smadzeņu darbību pelēm, kuri neslimo ar diabētu (Wenjun *et al.*, 2019).

Jaunākie epidemioloģiskie pētījumi liecina, ka ārstēšana ar METF novērš diabēta slimnieku kognitīvo samazināšanos. Klīniskajā eksperimentālā pētījumā tika atklāts, ka pacientiem ar viegliem kognitīviem traucējumiem, izmantojot METF, notiek kognitīvi uzlabojumi. Preklīniskie pētījumi liecina, ka METF samazina Alcheimera līdzīgu patoloģiju AD peļu modeļos. Pētījumā izmantoja 11 mēnešus vecas *SAMP8* peles. Pelēm astoņas nedēļas katru dienu tika ievadītas METF devas pa 20 mg / kg / sc vai 200 mg / kg / sc. Pēc četrām nedēļām peles tika pārbaudītas T-labirintā ar izvairīšanos no šoka, priekšmetu atpazīšanu un Barnes labirintu. METF uzlaboja gan ieguvi, gan aizturi *SAMP8* pelēm, T-labirinta šoka izvairīšanās, jaunu objektu atpazīšanu un iegūšanu Barnes labirintā ar abām METF devām. METF uzlaboja mācīšanos un atmiņu spontānas sākšanās AD *SAMP8* peles modelī. Bioķīmiskā analīze norāda, ka METF uzlaboja atmiņu, samazinot *APPc99* un *pTau* (Farr *et al.*, 2019).

METF plaši izmanto kā pretdiabēta līdzekli, ir daudz ietekmes uz cilvēka metabolismu. Balstoties uz jauniem šūnu, dzīvnieku un epidemioloģiskiem pētījumiem, tika izvirzīta hipotēze, ka METF izraisa smadzeņu metabolisma izmaiņas diabēta pacientiem. Smadzeņu metabolisma ietekmēto perēkļu izpētei izmantoja 2-deoksi-2- [18F] fluoro-D-glikozes (FDG) pozitronu emisijas tomogrāfiju 2. tipa diabēta pacientiem, kuri lieto METF un kuri nelietoja metformīnu (neMETF). Salīdzinot ar neMETF grupu, statistiskā parametriskā kartēšana parādīja, ka METF grupā bija klasteri ar ievērojami augstāku metabolismu labajā temporālajā, labajā frontālajā un kreisā pakaušu daivas baltajā vielā un zemāku metabolismu kreisajā parahipokampā girusā, kreisajā fusiformu girusā un ventromedialā prefrontālā garozā. Korelācijas analīzes liecina, ka atteikšanās no METF samazina tā ietekmi uz baltas vielas hipermetaboliskām izmaiņām, kuras ir atkarīgas no ilguma. Tomēr hipometabolisma

atjaunošana PH, FG un VMPFC nebija nozīmīgi korelēta ar metformīna izdalīšanās ilgumu (Huang *et al.*, 2014).

Jaunākie preklīniskie un klīniskie pētījumi liecina, ka METF ne tikai uzlabo hronisku iekaisumu, uzlabojot vielmaiņas parametrus, piemēram, hiperglikēmiju, rezistenci pret insulīnu un aterogēnu dislipidēmiju, bet arī tam ir tieša pretiekaisuma darbība. Pētījumi liecina, ka METF nomāc iekaisuma reakciju, nomācot nukleāro faktoru kappā B (NFκB) caur AMPK atkarīgiem un neatkarīgiem ceļiem (Saisho, 2015). METF daudzos gadījumos nomāc iekaisumu un mazina vai novērš iekaisuma faktorus, galvenokārt caur atkarīgiem mehānismiem un dažreiz neatkarīgi no AMPK šūnu līmenī un, izmantojot citus veidus, sistemātiskajos līmeņos. Tas ir efektīvs samazinot oksidatīvā stresa faktoru līmeni, regulējot šūnas antioksidanta sistēmu. METF var būt piemērota ārstēšanas iespēja daudzām slimībām, kuru patoģenēzē ir nozīme iekaisuma procesos un oksidatīvajā stresā. NFκB ir transkripcijas regulators, kas iesaistīts iekaisumā. Regulējot signalizāciju, šis faktors var izjaukt vairākus iekaisuma procesus, šūnu nāvi un audu iznīcināšanu. Pārbaudē, ko veica pelēm ar muguras smadzeņu traumām, tika atklāts, ka tādās sarežģītās reakcijās kā lokāls iekaisums kopā ar mikroglijas proliferāciju un aktivizēšanu, fagocītu infiltrāciju un palielināto pre-iekaisuma citokīnu ražošanu notiek. METF var ierobežot neironu bojājumus izmantojot piemēroto pretiekaisuma efektu NFκB ekspresijas samazināšanā (Dehkordi *et al.*, 2019).

METF var ievērojami samazināt neiroiekaisumu un samazināt neironu diabēta dzīvnieku hipokampā, kas vēlāk var veicināt telpiskās atmiņas uzlabošanu. Salīdzinājumi ar METF devām no 100 līdz 200 mg /kg parādīja, ka pēdējais ir efektīvāks rezultāts STZ eksperimentālajās analīzēs. Jāatzīmē, ka METF var būt terapeitiska alternatīva pacientiem ar DMT1, kuriem ir kognitīvi traucējumi (Oliveira *et al.*, 2016).

METF – plaši lietots medikaments, veicina neiroģenēzi un uzlabo telpiskās atmiņas veidošanu. Netipisks PKC-CBP ceļš ir būtisks normālai neiroģenēzei no neironu prekursoriem un METF aktivizē šo ceļu, lai veicinātu grauzēju un cilvēku neiroģenēzi kultūrā. METF arī uzlabo neiroģenēzi pieaugušo peļu smadzenēs no CBP atkarīgā veidā, un tādā veidā uzlabo telpiskās apgriešanās mācīšanos ūdens labirintā. Tādējādi METF, aktivizējot *aPKC-CBP* ceļu, veicina neironu cilmes šūnas un uzlabo neironu funkcijas, tādējādi nodrošinot kandidāttematoloģisko pieeju nervu sistēmas terapijai (Wang *et al.*, 2012).

Izmantojot peļu primāros neironus no savvaļas tipa un cilvēka *tau* transgēnām pelēm, pierādīja, ka pretdiabēta līdzeklis METF inducē *PP2A* aktivitāti un samazina *tau* fosforilēšanos no *PP2A* atkarīgajos epitopos *in vitro* un *in vivo*. Šī *tau* defosforilēšanas spēja

var būt pilnībā bloķēta ar *PP2A* inhibitoriem okadaīnskābe un fostriecīns, apstiprinot, ka *PP2A* ir svarīgs novērotā starpnieks efekts (Kickstein *et al.*, 2018).

Pretdiabēta zālēm potenciāla AD ārstēšana parāda, ka insulīnu sensibilizējošais pretdiabēta līdzeklis METF (Glucophage®) palielināja A $\beta$  veidošanos, kas ir viens no galvenajiem AD patoloģiskajiem raksturlielumiem, veicinot APP šķelšanos  $\beta$  un  $\gamma$ -sekretāzes starpniecībā SH-SY5Y šūnās. METF izraisīja autofagosomu uzkrāšanos Tg6799 AD modeļa pelēs. Īpaši augsta  $\gamma$ -sekretāzes aktivitāte tika konstatēta arī autofagiskos vakuolos, acīmredzot jaunā A $\beta$  peptīdu ģenerēšanas vietā. Šie dati kopā liecina, ka METF izraisīta autofagosomu uzkrāšanās izraisīja palielinātu  $\gamma$ -sekretāzes aktivitāti un A $\beta$  veidošanos. Papildus eksperimenti pierādīja, ka METF palielina AMP aktivētās proteīnu kināzes fosforilēšanos, kas aktivizē autofāģiju un izraisa patoloģisku autofagosomu uzkrāšanos (Son *et al.*, 2016).

### 1.2.7. Glikozes hipometabolisma loma Alzheimerā slimībā

AD ietekmē gan neokorteksu, gan hipokampu, taču patoloģija nav vienveidīga vai tā ietekmē visus šūnu veidus. Fizikālās un ķīmiskās īpašības, funkcionālās īpašības, un neironu atrašanās vieta ietekmē to varbūtību tikt ietekmētam. Jo īpaši AD ir visvairāk bojāto lielprojekcijas neironu ar samērā garu aksonu. Šiem neironiem ir augstas enerģijas prasības (t.i., augsts metabolisma ātrums) un tāpēc smadzenes atkarīgas tikai no glikozes kā enerģijas ražošanas substrāta, to darbība ir tieši atkarīga no glikozes pieejamības un lietošanas kā arī no aksonu transporta (retrogrādi un anterogrādi) funkcionāla atbalsta kortikokortikālās projekcijas neironu aksoni pārvietojas lielos attālumos, kas padara šos neironus vairāk tendētus uz vairāku savienojumu izveidošanu un jutīgākus pret citoskeleta disfunkciju; un kam ir liels šūnu virsmas laukums, kas var palielināt iedarbību uz toksiskiem vides apstākļiem (Mosconi *et al.*, 2008).

Normālai sinapses funkcijai nepieciešams daudz koordinētu mehānismu, ieskaitot tādu gēnu produktu ģenerēšanu, kas ir atbildīgi par veidošanos un membrānu kompleksu uzturēšanu, mRNS, proteīnu rādītājus; vezikulu izplatīšana, atbrīvošanas un atkārtotas uzņemšanas regulēšana. Lai visas šīs darbības veiktu efektīvi, ir jāpiegādā pietiekami daudz enerģētisko izejvielu. Smadzenēs tiek iegūta brīvā enerģija, kas nepieciešama, lai vadītu lielāko daļu šūnu reakciju adenoziņa 5-trifosfāta fosforilēšana, ko galvenokārt ražo mitohondrijos no glikozes oksidācijas aerobos apstākļos. Tāpēc ir glikozes līmeņa traucējumi, metabolisms var būt ļoti tiešs sinaptiskās disfunkcijas noteicējs.

Normāla novecošanās procesa laikā smadzeņu šūnas iziet izmaiņas redoksa reakcijās un piedzīvo oksidatīvo stresu, traucēto enerģijas homeostāzi un bojātu proteīnu un lipīdu membrānas, kā arī oksidējošās modificētās nukleīda skābes bāzes. Novecošana ir saistīta ar mitohondriju samazināšanos funkciju un paaugstināta mitohondriju neaizsargātību pret toksīniem. Papildus izmaiņām mitohondrijos, neironiem ir arī traucēta glikozes uzņemšana normālam novecošanās laikam, tālāk apdraudot viņu spēju uzturēt jonu homeostāzi un citas no enerģijas atkarīgās šūnas procesus. Daudzi ar vecumu saistīti enerģijas metabolisma deficīti varētu būt oksidatīvā stresa sekas. Pārmērīgs oksidatīvais stress savukārt var radīt nelabvēlīgu šūnas vidi, kas pakļauj indivīdiem paaugstinātu patoloģisko bojājumu attīstības risku. Brīvo radikāļu novecošanās teorija liek domāt, ka oksidatīvais stress ir galvenais deģenerācijas spēlētājs šūnu skaitam. Šūnu cikla traucējumi ir viens no agrākajiem notikumiem AD, jo vecums ir primārais riska faktors lielākajai daļai AD gadījumu. Patogēnēzē ir iesaistīts oksidatīvais stress un slimības progresēšana. Pieaugošs pierādījumu kopums norāda, ka tas ir nepilnīgs vai mainīts enerģijas metabolisms varētu mainīt vispārējo neironu oksidatīvo mikrovidi AD laikā un tās patogēnēzi un progresēšanu, kas izraisa mitohondriju enzīmu izmaiņas un glikozes metabolismā AD smadzeņu audos (Zilberter *et al.*, 2017), (Mosconi *et al.*, 2008).

Vairāki FDG-PET pētījumi liecina, ka smadzeņu glikozes hipometabolisms galvenajos smadzeņu reģionos atšķiras AD gadījumā no normālas novecošanās. Pirms kognitīvās pavājināšanās un demences sākuma kā arī bezsimptomu FAD indivīdu vidū atrodams kognitīvi normālos subjektos ar subjektīvās atmiņas sūdzībām, kuri ir *APOE4* genotipa nesātāji. Reģionāla smadzeņu metabolisma glikozes patēriņa samazinājums tika novērots ar FDG-PET pirms slimības sākuma vairākās riska grupās, ieskaitot pacientus ar viegliem izziņas traucējumiem, bieži vien indivīdi, kas pārnēsā mutācijas (Zilberter *et al.*, 2017).

Vienā pētījumā ar FDG-PET pētīja, vai smadzeņu metabolisma glikozes patēriņa samazinājums, kas iepriekš tika konstatēti kognitīvi veseliem vidēja vecuma *APOE4* nesējiem, attiecas uz Latīņamerikāņu un Meksikas amerikāņu iedzīvotājiem. 11 *APOE4* nēsātājiem un 16 nēsātājiem no Arizonas latīņu kopienas darbiniekiem un bezdarbniekiem, kuru vidējais vecums 54 gadi, demences ģimenes anamnēzēs, klīniskajiem vērtējumiem un neiropsiholoģisko testu rezultātiem (Langbaum *et al.*, 2010).

### 1.2.8. Neuroiekaisuma loma Alzheimerā slimībā

Neuroiekaisums – process, kas saistīts ar vairāku neurodeģeneratīvu traucējumu rašanos, un tas ir svarīgs AD patoģenēzes un progresēšanas veicinātājs. Vairāki bojājuma signāli, piemēram, traumas, infekcija, oksidējoši līdzekļi, redoksdzelzs, *tau* oligomēri un A $\beta$ , izraisa nervu iekaisumu. Faktiski neuroiekaisums ir atbildīgs par proinflatīvo citokīnu patoloģisku sekrēciju, ierosinot signālceļus, kas aktivizē smadzeņu tau hiperfosforilēšanos atlikumos, kuri nav modificēti normālos fizioloģiskos apstākļos. Ir pierādījumi tam, ka AD patoģenēze neaprobežojas tikai ar neironu nodalījumu, bet ietver spēcīgu mijiedarbību ar smadzeņu imunoloģiskajām šūnām, piemēram, astrocītiem, mikroglījam un imūnšūnām. Tās infiltrējas no perifērijas, kas varētu dot ieguldījumu neuroinfekcijas un modifikācijas procesā (Maccioni *et al.*, 2009).

Neuroinfekcijas gadījumā iekaisums ir pamata imūnā atbilde, kas paredzēta, lai pasargātu ķermeni no kaitējuma, rodas no endogēniem un eksogēniem faktoriem. Tā kā smadzenes ir kontrolesistēmas imūnsistēmas šūna, mikroglījas pirmās reaģē uz infekciju vai audu traumu un ierosina iekaisuma reakciju. Izmantojot pilnu imūno receptoru klāstu, piemēram, *toll - like* veida receptorus (TLR), nukleotīdus saistošos oligomerizācijas domēnus (NOD), NOD līdzīgus receptorus un daudzus savācēju receptorus, mikroglījas kā arī citas CNS šūnas, piemēram, astrocīti spēj atpazīt kaitīgus stimulus un reaģēt, ražojot iekaisuma citokīnus, piemēram, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ,  $\gamma$ -interferonu (IFN $\gamma$ ) un vairākus ķemokīnus (Cherry *et al.*, 2014).

Arvien vairāk pierādījumu liecina, ka AD patoģenēze neaprobežojas tikai ar neironu nodalījumu, bet gan spēcīgi mijiedarbojas ar smadzeņu imunoloģiskajiem mehānismiem. Nepareizi salocīti un agregēti proteīni saistās ar modeļa atpazīšanas receptoriem mikro- un astroglījās un izraisa iedzimtu imūno reakciju, ko raksturo iekaisuma mediatoru izdalīšanās, kas veicina slimības progresēšanu. Genomas plašā analīze liecina, ka vairāki gēni, kuri palielina sporādiskas AD risku, kodē faktorus, kas regulē nepareizi salocītu proteīnu klīrensu un iekaisuma reakciju. Ārējie faktori, ieskaitot sistēmisku iekaisumu un aptaukošanos, iespējams, traucē smadzeņu imunoloģiskos procesus un vēl vairāk veicina slimības progresēšanu (Honeka *et al.*, 2015).

Mikroglījas ir centrālās nervu sistēmas makrofāgi. Tiem ir galvenā loma smadzeņu attīstībā un fizioloģijā dzīves un novecošanās laikā. Aprīkoti ar dažādiem molekulāriem sensoriem, izmantojot dažādas funkcijas, ir kritiski iesaistīti smadzeņu homeostāzes uzturēšanā. AD gadījumā sākotnēji tika uzskatīts, ka mikroglījas reakcija ir nejauša un to

izraisa A $\beta$  nogulsnes un distrofiski neirīti. Nesenie genoma mēroga asociācijas pētījumi atklāja, ka lielākā daļa AD risku ir atrodami gēnos, kas izteikti un dažreiz unikāli izpaužas mikroglijās. Kalcija signālierīces ir otrs galvenais kurjers gandrīz visu šūnu tipos un ir svarīgas normālai CNS darbībai. Ca<sup>2+</sup>pastarpina daudzas mikroglijas funkcijas. Īpaši mikroglijas reakcija ir saistīta ar intracelulāru kalcija palielināšanos - procesu, kas nepieciešama citokīnu un hemokīnu izdalīšanās ierosināšanai (Hemonnot *et al.*, 2019).

Arvien vairāk pierādījumu norāda, ka starp neironu bojājumiem un mikroglijas aktivizēšanu pastāv savstarpēja veicinoša saistība. No vienas puses, neironu bojājumi var veicināt nelielu toksicitāti, lai aktivizētu šūnas, citokīnu parakrīnu un autokrīno signālu, kas var izraisīt ilgstošu mikroglijas aktivizāciju. No otras puses, mikroglijas hronisku aktivizēšanu var izmantot kā smadzeņu citokīnu aktīvo brīvo radikāļu organizāciju, šie faktori kopā veicina neironu bojājumus un veido apburto loku. Uzskatīta par hronisku neironu deģenerāciju kā svarīgu mehānismu seksuāli transmisīvās slimības procesā. Zāles, kas kavē mikroglijas aktivizēšanu, zināmā mērā var aizsargāt dopamīnerģiskos neironus, tam ir liela nozīme arī dopamīnerģisko neironu traumu zaudēšanas procesā no mikrogliju aktivizācijas puses (Li *et al.*, 2014).

CNS astrocīti ir glijas šūnas, kas veic būtiskus uzdevumus. Tās ietver enerģijas metabolismu, neurotransmisiju, jonu un ūdens stabilu līmeni, kā arī imūno aizsardzību un kontrolē vietējo asins plūsmas / skābekļa līmeni. No neironu cilmes šūnām astrocīti diferencējas apakštipos, kas atšķiras no dzīvnieku sugām. Cilvēka smadzeņu garozas astrocīti ir izturīgāki, citoloģiski un funkcionāli sarežģītāki, kontrolē plašākus domēnus un ātrāk izplata kalcija signālus nekā viņu grauzēju kolēģi. Viņi aktīvi piedalās CNS homeostāzes uzturēšanā un funkcionēšanā, sadarbojoties ar neironiem, citiem glijas šūnu veidiem un smadzeņu asinsvadu šūnām (Dal Par *et al.*, 2018). Astrocītu funkcijas izmaiņas novērotas smadzenēs cilvēkiem ar AD, kā arī AD *in vitro* un *in vivo* dzīvnieku modeļos. Ir pierādīts, ka A $\beta$  klātbūtne traucē gliotransmisiju, neurotransmiteru uzņemšanu un maina kalcija signālu astrocītos. Turklāt astrocīti ekspresē APOE un ir iesaistīti A $\beta$  ražošanā, sadalīšanā un noņemšanā. Kā arī astrocītu izmaiņas, kas notiek pirms citām AD novērotajām patoloģiskajām īpašībām, norāda uz agrīnu astroglijas ieguldījumu šajā slimībā. Astrocīti piedalās centrālās nervu sistēmas iekaisuma un imūnās atbildēs reakcijās. A $\beta$  klātbūtne aktivizē dažādus šūnu receptorus un intracelulāros signālu pārnesanas ceļus, galvenokārt uzlaboto glikācijas gala produktu receptoru un kodolfaktoru aktivēto B šūnu ķēdes pastiprinātāju NF $\kappa$ B ceļu, kas ir atbildīgs par pro-iekaisuma citokīnu transkripciju un kemokīnu astrocītos. Šo pretiekaisuma līdzekļu izdalīšanās var izraisīt šūnu bojājumus vai pat

stimulēt A $\beta$  veidošanos astrocītos. Turklāt A $\beta$  izraisa oksidatīvā stresa (OS) parādīšanos un reaktīvo skābekļa sugu un reaktīvo slāpekļa sugu veidošanos astrocītos, cita starpā ietekmējot intracelulāro kalcija līmeni, NADPH oksidāzi (NOX), NF $\kappa$ B signālus, glutamāta uzņemšanu (palielina risku eksitotoksicitāte) un mitohondriju funkciju (Gonzales-Reyes *et al.*, 2017).

Vienā pētījumā pārbaudīja saistību starp neuroiekaisumu un funkcionālā savienojamības traucējumiem liela mēroga tīklos un to kopīgo ietekmi uz izziņas traucējumiem. Apvienojot izohinolīna karboksamīdu, kas selektīvi saistās ar perifēro benzodiazepīnu receptoru, PET un miera stāvokļa funkcionālās magnētiskās rezonanses attēlveidošanu (28 pacientiem: 12 sievietēm un 16 vīriešiem ar iespējamā AD vai vieglu izziņas traucējumu klīnisko diagnozi ar pozitīvu PET biomarķieri amiloīdā un 14 pusaudžus ar izglītību veselīgas kontroles: 8 sievietēm un 6 vīriešiem. Uz avotu balstītu “iekaisumu” izmantoja, lai visiem dalībniekiem izdalītu PET signāla dispersijas galvenās sastāvdaļas. Vairāki lineārie regresijas modeļi identificēja signāla kovariācijas avotus starp neuroinflammāciju un smadzeņu savienojumu profiliem saistībā ar diagnostikas grupu (pacienti, kontrole) un izziņas stāvokli. Pacientiem bija ievērojami augstāka izohinolīna karboksamīda saistīšanās salīdzinājumā ar kontrolēm sadalītā telpiskā modelī, ieskaitot hipokampu, frontālo un zemāko laika garozu. Pacientiem ar pastiprinātu slodzi uz šo saistīšanās sadalījumu bija difūzā patoloģiskā funkcionālā savienojamība. Spēcīgākas asociācijas izpausme starp šādu patoloģisku savienojamību un augstāku neuroinfekcijas līmeni korelēja ar sliktāku kognitīvo deficītu. Pētījums liecina, ka neuroiekaisums ir saistīts ar tīkla funkcijas patofizioloģiskām izmaiņām, kas ir AD kognitīvās nepilnības. Neuroiekaisums un tā saistība ar funkcionāli nozīmīgu smadzeņu tīklu reorganizāciju tiek ierosināts kā mērķis topošajām imūnterapijas stratēģijām, kuru mērķis ir novērst vai palēnināt demences rašanos. Pētījums sniedz skaidrus pierādījumus tam, ka *in vivo* neuroiekaisums AD pasliktina liela mēroga tīkla savienojumu; un ka saikne starp neuroiekaisumu un funkcionālā tīkla savienojumu ir būtiska izziņas traucējumi (Passamonti *et al.*, 2019).

Iba-1 ir citoplazmatisks proteīns, kas izteikts monocītu cilmes šūnās un smadzenēs, un galvenokārt ierobežots ar mikroglijām. Lai arī tiek uzskatīts, ka tā ekspresija palielinās līdz ar mikroglijas aktivizēšanu, kur tas var būt iesaistīts membrānas sabojāšanā un fagocitozē (Hopperton *et al.*, 2018).

Acetilholīnesterāze (AChE) ir holīnerģiskās nervu sistēmas galvenais enzīms, kas parasti tiek saistīta ar A $\beta$  plātnītēm un NFT. AD progresēšanas laikā pasliktinās daudz dažādu veidu neironu, kaut arī ir piedzīvoti pamatīgi priekšējās smadzeņu holīnerģisko neironu zudumi, ko papildina progresējošs AChE samazinājums. Tiek ietekmēts gan acetilholīna

sintezējošais enzīms holīna acetiltransferāze (ChAT), gan AChE. Terapijas, kas paredzētas holīnērgiskā deficīta novēršanai, lielākoties balstās uz holīnērgiskās funkcijas nozīmi izziņā. Neskatoties uz kopējo AChE aktivitātes samazināšanos AD smadzenēs, pašreizējā AD terapija lielākoties balstās uz AChE inhibitoriem, kas pastiprina holīnērgisko transmisiju, bet kuriem ir pieticīga un īslaicīga terapeitiskā iedarbība. AChE var pastāvēt vairākās dažādās molekulārajās formās, kurām ir specifiski izpausmes modeļi dažādos šūnu tipos (Garcia-Ayllon *et al.*, 2011).

SYP-1 ir transmembrānas glikoproteīns, kas atrodams mazos nervu šūnu presinaptiskajos pūslīšos un neuroendokrīno šūnu mikrovezikulās. SYP ir svarīgs sinaptiskais marķieris, kas ļauj, izmantojot gaismas un konfokālo lāzera mikroskopiju, iegūt ticamus datus par centrālās nervu sistēmas sinaptisko struktūru morfoloģisko organizāciju. Funkcionālā loma šūnā un SYP ir imūnhistoķīmijas izmantošana sinaptisko kontaktu marķēšanai (Kolos *et al.*, 2015).

### 1.2.9. Smadzeņu neuroģenēze

Neurodeģeneratīvie apstākļi, kas saistīti ar kognitīvo pasliktināšanos, ieskaitot AD, bieži tiek saistīti ar dendrītisko mugurkaula smadzeņu skaita un formas izmaiņām pirms neironu nāves. AD neurodeģenerācijai ir raksturīgas izmaiņas neurotransmiteru ekspresijā, Aβ proteīnu uzkrāšanās (Aβ plātnītes), kā arī plaša mēroga neironu nāve un neironu atrofija slimības beigu fāzē. Atmiņas defekti un citas kognitīvās funkcijas sākotnējās slimības stadijās ir saistītas ar izmaiņām hipokampā un entorhinālajā garozā. AD laikā pat 80% hipokampu neironu var nomirt, un šis progresējošais zaudējums ir acīmredzams kognitīvās izmaiņas un citi simptomi, kas novēroti AD pacientiem. Šūnu tipi, kurus ietekmē AD ir *locus ceruleus*, smadzeņu stumbra kodoli (piemēram, raphe nucleus), retikulāra veidošanās, amigdala, *substantia nigra*, striatums, hipotalāms, talāmus un claustrum, kā arī atsevišķi smadzeņu garozas reģioni. Ietekmētie neironu tipi dažādos reģionos atšķiras atkarībā no neurotransmiteru, neimodulatoru un neuropeptīdu ekspresijas. Deģeneratīvā procesa rezultātā rodas smadzeņu atrofija un neironu zudums. Slimības patobioloģija ietekmē arī neneironu šūnas: oligodendrocītus, astrocītus, mikroglijas un koroidālais pinums notiek visos deģeneratīvos procesos (Kocahan *et al.*, 2017).

Pieauguša cilvēka vecumā jaunu neironu pievienošana fizioloģiskos apstākļos notiek dabiski divos smadzeņu reģionos – sānu kambara/rostrālās migrācijas plūsmā un hipokampāla *dentate gyrus* (DG). Pēdējās desmitgadēs hipokampāla DG nozīme arvien pieaug. Šī atbilstība

ir izskaidrojama ar to, ka tā piedalās atmiņas iegūšanā, apstrādē un konsolidācijā. Turklāt ir pārlicinoši pierādījumi, ka pieaugušo hipokampu neuroģenēzi (AHN) līmenis cilvēkiem saglabājas pieauguša cilvēka vecumā. Hipokampu un šīs struktūras galvenos efektus entorīnajā garoza smagi ietekmē neurodeģeneratīvās slimības kopumā un jo īpaši AD, kas ir viena no lielākajām mūsdienu slimībām. Stāvokļa neiropatoloģiskās pazīmes ir *tau* NFT un A $\beta$  senīlās plātnītes. Turklāt atsevišķiem jutīgiem smadzeņu reģioniem ir vispārējs nervu plastiskuma trūkums un izteiktas sinaptiskas izmaiņas, vēl neārstējamās slimības progresēšanas laikā. Vienu no šiem reģioniem, hipokampu, raksturo nepārtraukta jaunu neironu pievienošana visā dzīves laikā. Šī parādība, kas nosaukta par AHN, nodrošina potenciāli bezgalīgu jaunu sinaptisko elementu avotu, kas palielina hipokampu shēmas sarežģītību un plastiskumu. Daudzas liecības liecina, ka fiziskās aktivitātes un apkārtējās vides bagātināšana ir vieni no spēcīgākajiem pozitīvajiem AHN regulatoriem. Ņemot vērā to, ka daudzās neurodeģeneratīvās slimībās neironu plastika ir ievērojami samazināta, dažu dzīvesveida izmaiņu, piemēram, fizisko aktivitāšu palielināšanas, terapeitiskais potenciāls tiek atzīts vairākās nefarmakoloģiskās stratēģijās, kuru mērķis ir palēnināt vai novērst šo slimību progresēšanu. Hipokamps un tā galvenā aferentā struktūra, entorīnā garoza, ir divas no pirmajām jomām, kuras ietekmē AD progresēšana. Šajos smadzeņu reģionos neironiem ir morfoloģiskas izmaiņas, kā arī izteikts viņu aferento un eferento savienojumu samazinājums. Nepārtraukta jaunu neironu pievienošana trisinaptiskajai ķēdei kalpo par nebeidzamu jaunu sinaptisko savienojumu avotu, ko var precīzi noregulēt, reaģējot uz mainīgo vidi vai mainīgajām informācijas apstrādes prasībām. Šajā sakarā AHN ir parādījusies kā alternatīva stratēģija neiroplasticitātes saglabāšanai hipokampā (Llorens-Martin, 2018).

Sinaptiskie zaudējumi ir cieši saistīti ar AD kognitīvajiem traucējumiem. Sinapses zudums, iespējams, ir sinaptiskās disfunkcijas morfoloģiskais atspoguļojums, kas sākas agrīnā slimības stadijā. Agrīni *post-mortem* smadzeņu audu struktūras pētījumi parādīja, ka AD pacientiem bija samazināts dendrītisko mugurkaulu skaits un samazināts sinapses blīvums hipokampā un garozā, salīdzinot ar smadzeņu audiem, kas atbilst vecumam. Bija tieša korelācija starp palielinātu dendrītisko mugurkaula zaudējumu un garīgā stāvokļa pasliktināšanos. Tāpēc progresējošā dendrītisko mugurkaulu atrofija ir proporcionāla AD patoģenēzē un var būt precīzs slimības progresēšanas rādītājs (Kocahan *et al.*, 2017).

Jaunajā pētījumā pētnieki atklāja, ka peļu apstrāde vairāku mēnešu laikā ar P110 samazināja mikroglijas un astrocītu aktivitāti un iekaisumu dzīvnieku smadzenēs. Turpmākos eksperimentos, izmantojot kultivētās šūnas, atklāja, ka gan mikroglijas, gan astrocīti var izraisīt bojātas mitohondriji savā apkārtnē un ka tie var sabojāt un iznīcināt neironus. Šie

eksperimenti arī parādīja, ka P110 var to bloķēt. Veselīgas šūnas var izraidīt arī mitohondrijus, un tas nerada kaitējumu. Tomēr iekaisušie mikroglijas un astrocīti izraidīja bojātos mitohondrijus, kas bija nāvējoši tuvumā esošajiem neironiem. Atklāja, ka P110 spēja pietiekami bloķēt mitohondriju fragmentāciju mikrogliji un astrocītu iekšpusē, lai ievērojami samazinātu neironu nāvi (Paddock, 2019).

Holīnerģiskās signālfunkcijas disfunkcija ir saistīta arī ar traucētu RNS pārstrādi, izraisot dendrītu zudumu garozas neironos un BACE1 proteīna līmeņa paaugstināšanos, kas pierādīts, ka paaugstināts vēlīnās AD stadijās. Hipokampu un tā darbību būtiski ietekmē holīnerģiskā disfunkcija. Ir pierādīts, ka holīnerģiskas projekcijas no mediālā starpsienas laukuma līdz hipokampam ir ievērojami samazinātas AD pacientiem un AD peles modelī. Turklāt pacientiem ar AD ir novērots holīnerģisko receptoru līmeņa pazemināšanās hipokampā un samazināta AChE saistīšanās šajā reģionā (Haam *et al.*, 2017).

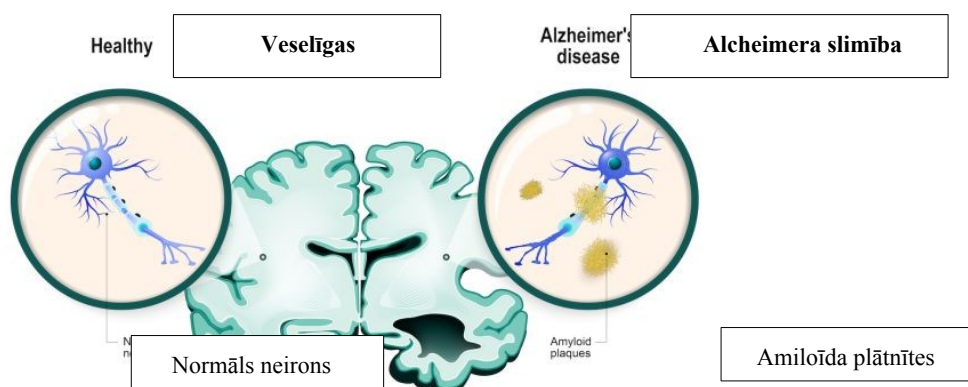
### 1.2.10. Alzheimeras slimības simptomi un riski

Smadzeņu izmaiņas, kas saistītas ar AD, var sākties desmit gadus vai ilgāk, pirms cilvēks sāk izjust simptomus. Saskaņā ar Alzheimeras asociācijas datiem visizplatītākais agrīnais AD simptoms ir grūtības atcerēties tikko uzzināto informāciju, piemēram, nesenās sarunas, notikumus vai cilvēku vārdus. Bet ne visiem sākotnējās ir atmiņas problēmas, un dažiem cilvēkiem vispirms var mainīties viņu uzvedība, valodas grūtības vai redzes problēmas (MacGill, 2018).

AD gaitu var iedalīt sekojošās stadijās:

1. *Agrīnajā stadijā* – grūtāk apgūt jaunu informāciju, atrast pareizo vārdu, lai kaut ko aprakstītu, atcerēties, kas tikko noticis – viegli izziņas traucējumi (*mild cognitive impairment*, MCI), vai plānot un organizēt darbību, kurai nepieciešama izpildvaras darbība.
2. *Vidējā stadija* – spēja skaidri domāt kļūst apgrūtināta. Ilgtermiņa atmiņa bieži zūd, un var samazināties vizuālās un telpiskās spējas kā rezultātā cilvēki var klejot vai pazust. Emocionālās un uzvedības izmaiņas, piemēram, nemiers un uzbudinājums, ir raksturīgas vidējā posmā, un tās var izaicināt rīkoties gan tiem, kuri dzīvo ar demenci, gan viņu tuviniekiem.
3. *Vēlīnā stadija* – fiziskā darbība ievērojami pasliktinās, apgrūtinot tādus uzdevumus kā staigāšana, ģērbšanās un ēšana. Galu galā persona ar vēlīnu AD stadiju kļūst pilnībā

atkarīga no aprūpētājiem, lai palīdzētu viņu pamatvajadzību apmierināšanā (Heerema, 2020).



**1.2.10.1.attēls. Alcheimera slimības gadījumā plātnītes ieskauj neironus un izraisa smadzeņu nervu šūnu nāvi** (Nierenberg, 2019).

Neskatoties uz to, ka viens no AD riska faktoriem ir vecums, agrīnā AD skar cilvēkus, kas jaunāki par 60 gadiem, un dažas slimības formas var būt arī iedzimtas. Tomēr saskaņā ar Nacionālā novecošanās institūta datiem slimība ar agrīnu sākumu veido mazāk nekā 10% no visiem cilvēkiem ar traucējumiem. AD ar novēlotu sākumu ir biežāka slimības forma, un tās pirmie simptomi var parādīties pēc 65 gadu vecuma (Nierenberg, 2019).

Daži svarīgie riska faktori, piemēram, vecums un ģenētika, var palielināt AD tendenci. Turklāt ir arī modificējami riska faktori ārējā medicīnisko stāvokļu un dzīvesveida izvēles ziņā – kas spēj AD attīstību. Šiem riska faktoriem ir savi bioloģiskie mehānismi, kas var veicināt AD etioloģiju un patoloģiskas sekas. Tādēļ alternatīva stratēģija cīņai ar AD varētu būt zināmo modificējamo riska faktoru un ar tiem saistīto slimības mehānismu novēršana, kas sevī ietver dzīvesveida maiņu, izvairīšanos no kaitīgiem ieradumiem, izvairīšanos no galvas smadzeņu traumām, kā arī ārstēt tādas blakusslimības kā asinsvadu slimības (hipertensija, insults, išēmija), diabēts, depresija u.c. Šie faktori spēj samazināt A $\beta$  nogulsnešanos un uzlabot kognitīvos traucējumus. Jaunākie pētījumi ir aprēķinājuši, ka vairāku modificējamo riska faktoru ieviešanās varētu novērst līdz 35% no demences gadījumiem. Diētas, fizisko aktivitāšu un asinsvadu slimību pārvaldība riska grupās gados vecākiem cilvēkiem faktiski var novērst kognitīvās funkcijas pasliktināšanos. Tomēr daži ziņojumi liecina, ka izmaiņas šajos ieradumos jāveic agrīnā dzīves posmā, jo, modificējot

vēlāk dzīvesveida faktoros, iespējams, netiks samazināti MCI pārveidošanās par AD, lai gan tas var uzlabot slimības gaitu (Edwards *et al.*, 2019).

### 1.3. Alcheimera slimības terapija

AD ārstēšanas izvēles joprojām ir limitētas. Pieejamā farmakoterapija sniedz mērenu simptomātisku efekta samazinājumu. Pastāv arī nefarmakoloģiska terapija, kas ir ļoti noderīga un nereti spēj uzlabot pacienta ikdienas funkcionēšanu tikpat labi kā medikamentozā ārstēšana, pielieto to slimniekiem ar atmiņas zudumu, lai uzturētu smadzeņu darbību, darbojoties ar palīgmateriāliem (kalendārs, bildes u.c.), uzlabojot atmiņu, piemēram, mūzikas terapija – aktivizē bazālos ganglijus un smadzenītes, kas relatīvi nav skarti AD gadījumā, uz kuru AD pacienti pozitīvi reaģē, regulārie aerobie vingrinājumi – pastaigas, peldēšana pozitīvi ietekmē slimības gaitu, veicinot smadzeņu (hipokampa) neuroģenēzi un tā uzlabojot kognitīvās spējas (Gudreniece *et al.*, 2017).

Ir ierosināta AD agregācija, tau agregācija, metāla dishomeostāze, oksidatīvais stress, holīnerģiskā disfunkcija, iekaisums un autofagijas mazināšana, pamatojoties uz patofizioloģiskām izmaiņām, kas rodas AD sākšanās un progresēšanas laikā. Pašlaik nav efektīvas ārstēšanas, tomēr pašreizējā AD farmakoloģiskā ārstēšana ar zālēm, piemēram, holīnesterāzes inhibitori un N-metil-D-aspartāta (NMDA) receptoru antagonisti uz izmantošanu vieglas, vidēji smagas un smagas slimības gadījumā, galvenokārt palīdz pārvaldīt simptomus, tādējādi novēršot vajadzību pēc jaunām metodēm, kā arī rīkoties ar AD pamatā esošajiem mehānismiem. Turpmākā terapija var optimizēt pašlaik pieejamās zāles un palēnināt AD simptomu vai pat AD patoloģijas progresēšanu (Grossberg *et al.*, 2019). Holīnesterāzes inhibitori (*Rivastigminum*, *Donepezili hydrochloridum*, *Galantamini hydrochloridum*) – ieteicams nozīmēt uzreiz pēc diagnozes uzstādīšanas, jo šī medikamentu grupa pozitīvi ietekmē atmiņas saglabāšanos, uzlabo kognitīvās funkcijas pacientiem ar mēreni un vidēji izteiktu AD, samazina uzvedības traucējumus. NMDA receptoru antagonisti (*Memantini hydrochloridum*) atšķirās no tā, ka šī grupa der visām AD attīstības stadijām, pozitīvi ietekmē kognitīvās funkcijas. Tas samazina uzbudināmību un agresiju. Depresijas ārstēšanai cilvēkiem priekšrocībā pielieto selektīvos serotonīna atpakaļsaistīšanās inhibitorus (*Escitalopramum*, *Fluoxitinum*, *Citalopramum*, *Sertralinum*). AD slimniekiem pielieto arī antipsihotiskos medikamentus, kā uzvedības simptomu ārstēšanai izmanto *Risperidonum*, to nozīmē pacientiem ar izteiktiem un smagiem psihiatriskiem un uzvedības traucējumiem. Šo

medikamentu nozīmēšana un lietošana jāveic ļoti piesardzīgi – mazās devās un uz īsu periodu, jo tiem ir nopietnas blaknes, piemēram, kognitīvo funkciju pasliktināšanās, paaugstinātais insulta risks, parkinsonisms un arī mirstības risks (Gudreniece *et al.*, 2017).

Viena no ārstēšanas metodēm varētu būt patogēno mehānismu A gadījumā – oksidatīvais stress. Skābekļa metabolisms rada brīvos radikāļus, piemēram, reaktīvos slāpekļa veidus un reaktīvos skābekļa veidus, ieskaitot superoksīda anjonu un hidroksilradikālu. Viena no agrīnām izmaiņām, kas novērotas AD pacientiem, ir palielināts oksidatīvais bojājums. Ir pierādīts, ka 8-hidroksideoksiguanosīna un 8-hidroksiguanozīna (DNS un RNS oksidācijas marķieri), 4-hidroksinonenāla un F2-izoprostanes (lipīdu peroksidācijas marķieri), proteīnu karbonilu un 3-nitrotirozīna (proteīnu oksidācijas marķieri) procentuālais sastāvs) un malondialdehīda koncentrācija ir palielināta AD smadzenēs. Lai arī dati ir ļoti ierobežoti, oksidatīvais stress var ietekmēt arī tau proteīnu hiperfosforilēšanos un polimerizāciju. Kaut arī oksidatīvajam stresam ir liela nozīme AD, joprojām tiek diskutēts par to, vai tam ir slimības izraisītāja loma vai sekundāras pazīmes AD novērotajām patoloģiskajām izmaiņām (Keskin *et al.*, 2019).

#### **1.4. Streptozocīna izmantošana Alcheimera slimības modelēšanai**

STZ ir glikozamīna-nitrozourīnvielas savienojums, kas iegūts no augsnes baktērijām *Streptomyces achromogenes* un sākotnēji izstrādāts kā pretvēža līdzeklis. Mūsdienās STZ izmanto tikai pētījumos, jo 1963. gadā eksperimentā ar dzīvniekiem atklāja, ka STZ izraisa diabētu. Kopš tā laika STZ sistemātiska lietošana kļuva par visbiežāk pētīto eksperimentālo modeli no insulīnatkarīgā (1. tipa) cukura diabēta. Savienojums ir selektīvi toksisks pret insulīnu ražojošām aizkuņģa dziedzera beta šūnām, kas izskaidrojams ar tā absorbciju šūnās ar zemas afinitātes glikozes transportētāja (GLUT)2 proteīnu, kas atrodas to šūnu membrānās. STZ citotoksicitāte galvenokārt rodas DNS alkilēšanas rezultātā, kas izraisa šūnu nekrozi. Turklāt aizkuņģa dziedzera beta šūnām pielietotais STZ sistemātiski bojā arī citus GLUT2 ekspresējošos orgānus, piemēram, nieres un aknas, turpretī smadzenes netiek tieši ietekmētas, jo hematoencefaliskā barjerā trūkst šī transportētāja proteīna. Tomēr viena vai divas intracerebroventrikulāra (icv) STZ injekcijas hroniski samazina smadzeņu glikozes uzņemšanu un smadzeņu masu, nozīmīgu Aβ proteīna līmeņa palielināšanos hipokampā, kā arī hipokampa un smadzeņu garozas hiperfosforilētā tau proteīna līmeņa palielināšanos un rada vairākus citus efektus, kas atgādina AD molekulārās, patoloģiskās un uzvedības pazīmes. STZ radītā hiperglikēmija provocē oksidatīvo stresu, veidojot brīvos

radikāļus. STZ toksicitāte ir atkarīga no polimerāzes (PARP) un poli (ADP-ribozes) rašanas, grauzēji bez šī proteīna ir rezistenti pret toksīnu. Pēc icv STZ injekcijas ievadīšanas smadzenēs, tika novērots, ka insulīna transports rada bojājumus un arī glikogēna sintāzes kināzes-3b (GSK3b) pāraktivāciju, palielinātu *tau* proteīna fosforilāciju un samazinātu glikozes transportieru līmeņi (Grieb, 2016).

Tika veikts pētījums kura galvenais mērķis bija novērtēt ar AD saistīto proteīnu, piemēram, A $\beta$ , ChAT, sinapsīna, aksonu neurofilamentu un *tau* fosforilēšanu, ekspresiju hipokampā pēc icv ievadīšanas STZ daudzuma pieaugušām pelēm. Ar jaunu objektu atpazīšanas testu analizēja STZ ietekmi uz īstermiņa un ilgtermiņa atmiņu. Peļu tēviņiem tika injicēts STZ vai citrāta buferšķīdums (CB), un ar proteīniem saistītie proteīni tika novērtēti ar imūnblotēšanas testiem hipokampā 7, 14 vai 21 dienā pēc injekcijas. 7 dienu laikā netika konstatētas atšķirības starp grupām. Lielākā daļa novērtēto AD marķieru tika atrasti mainīti 14 dienu laikā, STZ grupa uzrādīja paaugstinātu A $\beta$  proteīna un neurofilamenta ekspresiju, paaugstinātu *tau* proteīna fosforilēšanos un samazinātu sinapsīna ekspresijas līmeni salīdzinājumā ar kontroli. Visas šīs neiroķīmiskās izmaiņas, izņemot sinapsīnu, bija īslaicīgas un neparādījās līdz 21 STZ injekcijas dienai. Turklāt pēc STZ ārstēšanas 14 un 21 dienā ar STZ tika pierādīts gan īstermiņa, gan ilgtermiņa atmiņas deficīts (Ravelli *et al.*, 2017).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Izmantotie reaģenti un antivielas

Vara sulfāts (102790), metformīns (317240), kālija heksacianoferātsIII (104973) un nātrija citrāts (106448) nopirkti no Merck Millipore (ASV). No Sigma-Aldrich (ASV) iegādājās: 3,3'-diaminobenzidīnu (DAB, D5905), 5,5'-ditiobisu (2-nitrobenzoscābi) (DTNB, D8130), AChE (C2888-500UN), acetiltioholīna jodīdu (ATCI, 01480), DPX - distirēna, plastifikatora un ksilola maisījums (44581), etopropazīns (E5406), anti-SYP-1 antivielu (S6758), Meijera hematoksilīna šķīdumu (MHS16), neostigmīna bromīdu, radioimmūnoprecipitācijas testu (RIPA) buferšķīdumu (R0278), STZ (S0130) un Triton X-100 (X100). Trušu anti-Iba-1 antivielas (019-19741) piegādāja Wako (Japan). SuperBlock™ bloķējošais buferis (37515) un kazas anti-peles Ig (31430) iegādāti no uzņēmuma ThermoFisher Scientific (ASV). S-acetiltioholīna jodīds (A16802) un niķeļa amonija sulfāta heksahidrātu (12519) iegūti no Alfa Aesar (ASV). Nātrija citrāta buferšķīdumu (CB, pH 4, 5) pagatavoja *ex tempore* un izmantoja, lai izšķīdinātu tajā STZ.

### 2.2. Dzīvnieki

Eksperimentā izmantoja 70 *Wistar* žurku tēviņus (svars  $280 \pm 20$  g), piegādātus no Tartu Universitātes laboratorijas dzīvnieku centra audzētavas Igaunijā. Dzīvniekus turēja Latvijas Universitātes Dabaszinātņu Akadēmiskā centra eksperimentālajās telpās, individuāli ventilējamos būros (*Scanbur*, GM900), katrā būrī 4 dzīvniekus. Eksperimentālajā telpās ievēroja 12 stundu gaismas tumsas ciklu, gaisa temperatūru  $21 \pm 3$  °C, gaisa mitrumu 60 – 65%. Dzīvniekiem nodrošināja standarta granulēto laboratorijas barību (*SSniff*, V1534-300) un ūdeni *ad libitum*. Visas eksperimentālās procedūras un dzīvnieku aprūpe notika saskaņā ar Eiropas Savienības direktīvu 2010/63/EU “*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes*” (2010), un tika saskaņotas ar Latvijas Pārtikas un Veterinārā dienesta Dzīvnieku Aizsardzības Ētikas padomi.

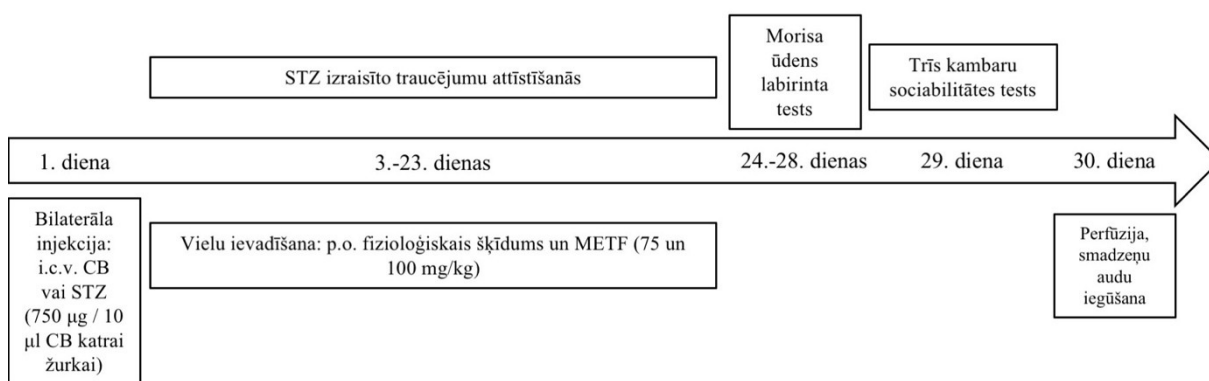
### 2.3. Eksperimenta dizains

Eksperimentālais dizains ir parādīts 2.3.1.attēlā. Dzīvnieki tika sadalīti sešās eksperimentālajās grupās (9-10 dzīvnieki katrā). Atkarībā no grupas, dzīvniekiem 21 secīgu dienu laikā tika perorāli (p.o.) ievadīts fizioloģiskais šķīdums (1 ml/kg) vai metformīns (75

vai 100 mg/kg), izmantojot gastrālo zondi, sākot no 2. dienas pēc icv STZ ievadīšanas. Grupas bija sekojošās:

- 1) CB icv + fizioloģiskais šķīdums 1 ml/kg p.o. (kontroles grupa, n=9)
- 2) STZ icv + fizioloģiskais šķīdums 1 ml/kg p.o. (bojājuma grupa, n=10)
- 3) CB icv + metformīns 75 mg/kg p.o. (n=9)
- 4) CB icv + metformīns 100 mg/kg p.o. (n=9)
- 5) STZ icv + metformīns 75 mg/kg p.o. (n=10)
- 6) STZ icv + metformīns 100 mg/kg p.o. (n=10)

Eksperimenta 24. – 28. dienā veica Morisa ūdens labirinta testu, kas ir sīkāk aprakstīts Aleksandras Gžibovskas maģistra darbā (2019), savukārt 29. dienā veica trīs kambaru sociabilitātes testu, kas aprakstīts Ievas Laubes bakalaura darbā (2019).



### 2.3.1.attēls. Eksperimenta plāns.

Eksperimenta pirmajā dienā dzīvniekiem, atkarībā no grupas, veica icv STZ vai CB injekciju. Šim nolūkam dzīvnieki tika anestezēti ar izoflurānu (3 - 3,5% indukcijai un 2% uzturēšanai), 70% N<sub>2</sub>O/30% O<sub>2</sub> indukcijai un ar 50% N<sub>2</sub>O/50% O<sub>2</sub> uzturēšanai. Pēc tam dzīvnieki tika fiksēti uz stereotakses rāmja (Stoelting Inc., ASV). Galvaskausā virs abiem sānu kambariem tika urbti divi caurumi, izmantojot šādas koordinātas (Paxinos and Watson, 2007): -0,7 mm anteriopozitīvi, 1,7 mm viduvēji un - 4,0 mm dorsoventralāli attiecībā pret bregmu. Izmantojot Hamiltona mikrošļirci, STZ divpusēji tika ievadīts (750 µg / 10 µl CB katrai žurkai) ar ātrumu 1 µl / min un 5 µl uz vienu ventrikuli. Kontroles grupa saņēma divpusējas CB injekcijas (10 µl katrai žurkai). Vienu dienu pēc operācijas dzīvniekiem ļāva atpūsties 24 stundas, un viņu stāvoklis tika rūpīgi novērots.

## 2.4.Imūnhistoķīmiskā analīze

Eksperimenta 30. dienā žurkas tika dziļi anestezētas ar intraperitoneāli (ip) ievadītu ketamīna un ksilazīna (100 mg/kg un 10 mg/kg, attiecīgi) maisījumu, tad perfuzēja ar ledus aukstu fizioloģisko šķīdumu, kam sekoja perfūzija ar ledus aukstu 4% paraformaldehīda (PFA) šķīdumu audu fiksēšanai. Smadzeņu kreisās puslodes izmantoja *Western* blota analīzē, savukārt labās smadzeņu puslodes 24 stundas fiksēja 4% PFA šķīdumā. Pēc fiksācijas, puslodes ievietoja 30% sukrozi saturošā šķīdumā uz 48 stundām krioprotekcijas nolūkos, un pēc tam ievietoja antifrīza šķīdumā, kurā tās uzglabāja pirms griešanas.

Izmantojot kriotomu (*CM1850, Leica Biosystems, ASV*), pie  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūras no katras smadzeņu puslodes ieguva 30  $\mu\text{m}$  biezas koronālos griezumus. Tos inkubēja CB (pH 6,0)  $95^{\circ}\text{C}$  temperatūrā 10 minūtes, lai uzlabotu antigēna atsegšanu, pēc tam atdzesēja līdz istabas temperatūrai un bloķēja ar *SuperBlock*® šķīdumu 1 stundu, lai samazinātu fona veidošanos. Tad griezumus pārnesa fosfāta buferšķīdumā (PBS), kas saturēja primāro antivielu (1:1000) ar 0,5% Triton X-100 (PBS-T). Pēc 18 stundu inkubācijas griezumus 3 reizes skaloja ar PBS-T un pārnesa šķīdumā, kas saturēja sekundāro antivielu (1:5000). Pēc 2 stundu inkubācijas šķīdumā, kas saturēja sekundāro antivielu, griezumus 3 reizes skaloja ar PBS-T.

Pēc skalošanas ar PBS-T, griezumus uz 1-2 minūtēm inkubēja PBS, kas saturēja DAB, 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  un 1% niķeļa amonija sulfāta. Iba-1 griezumus inkubēja kontrasta krāsvielas hematoksilīna šķīdumā uz 1 minūti. Visus iezīmētos griezumus pārnesa uz priekšmetstikliņiem (3 griezumus uz katra) un virsū pielīmēja segstikliņu, izmantojot histoloģijai paredzēto DPX līmi. Lai iegūtu vienmērīgu iekrāsojumu, visu grupu griezumi vienmēr tika iekrāsoti vienā un tajā pašā paplātē. Visi eksperimenti tika veikti trīs reizes.

## 2.5.Histoķīmiskā analīze

AChE saturoša nervu aksonu blīvuma histoķīmiskā noteikšana veikta, izmantojot iepriekš aprakstītu metodi, kas optimizēta un aprakstīta citur. No katra dzīvnieka labās smadzeņu puslodes tika iegūtas 6 koronālās sekcijas (30  $\mu\text{m}$  biezas, no 2,92 mm līdz 3,48 mm no bregmas). Iegūtās smadzeņu sekcijas ( $n = 5$  smadzeņu paraugi vienā grupā) skalotas ar 0,1 M maleāta buferšķīdumu (pH 6,0). Pēc tam sekcijas 2 stundas inkubēja ar 0,1 M maleāta buferšķīdumu, kas saturēja 86,5 mM S-acetiltioholīna jodīda, 30 mM etopropazīna, 30 mM vara sulfāta un 100 mM nātrija citrāta un 0,03 mM kālija heksacianoferāta. Pēc tam krāsu pastiprināja, inkubējot sekcijas ar 2,5% DAB, 0,2% ūdeņraža peroksīda un 5% niķeļa amonija

sulfāta 2 minūtes 0,05 M Tris buferšķīdumā (pH 7,6) 2 minūtes. Visi eksperimenti tika veikti trīs reizes.

## 2.6. Acetilholīna esterāzes aktivitātes novērtējums

Metformīna AChE inhibējošā aktivitāte tika novērtēta, izmantojot spektrofotometrisko metodi ar nelielām modifikācijām. Kā pozitīva atsauce tika izmantota neostigmīna bromīds. Reakcijas maisījums sastāvēja no paraugiem, kas satur 100 µl 0,1 M fosfāta buferšķīduma (pH 7,4), 10 µl AChE šķīduma (2 V / ml) un 10 µl metformīna vai neostigmīna bromīda dažādās koncentrācijās (0,01, 0,1, 0,2, 1, 5 un 10 mM). Šo maisījumu inkubēja tumsā 250°C temperatūrā 5 minūtes 96 iedobju plāksnē. Tad pievienoja 50 µl 0,75 mM DTNB, un plāksni inkubēja 20 minūtes. Pēc tam pievienoja 15 µl 1,5 mM ATCI un inkubēja 5 minūtes tumsā. Absorbēcija tika mērīta pēc 10 minūtēm pie viļņa garuma 405 nm, izmantojot ELx808™ mikroplašu lasītāju (BioTek Instruments Ltd., UK)

## 2.7. Kvantitatīvā noteikšana

Pēc imūnhistoķīmijas, priekšmetstikliņus digitāli skenēja ar *Pannoramic MIDI II* skeneri (3DHISTECH Ltd., Ungārija), izmantojot 20 × mikroskopa objektīvu. *Pannoramic Viewer 1.15.2* programmatūra (3DHISTECH Ltd., Ungārija) tika izmantota, lai iegūtu retrospleniālas garozas, hipokampa *cornu ammonis* (CA) 1 un 3 slāņi (CA1 un CA3) un DG granulu šūnu slāņu attēlus. Izmantojot iegūtos attēlus, tika izmērīti pētīto proteīnu optiskie blīvumi. Imūnhistoķīmisko datu kvantitatīvā noteikšana veikta, izmantojot attēlu apstrādes programmatūru (*ImageJ, Vācija*).

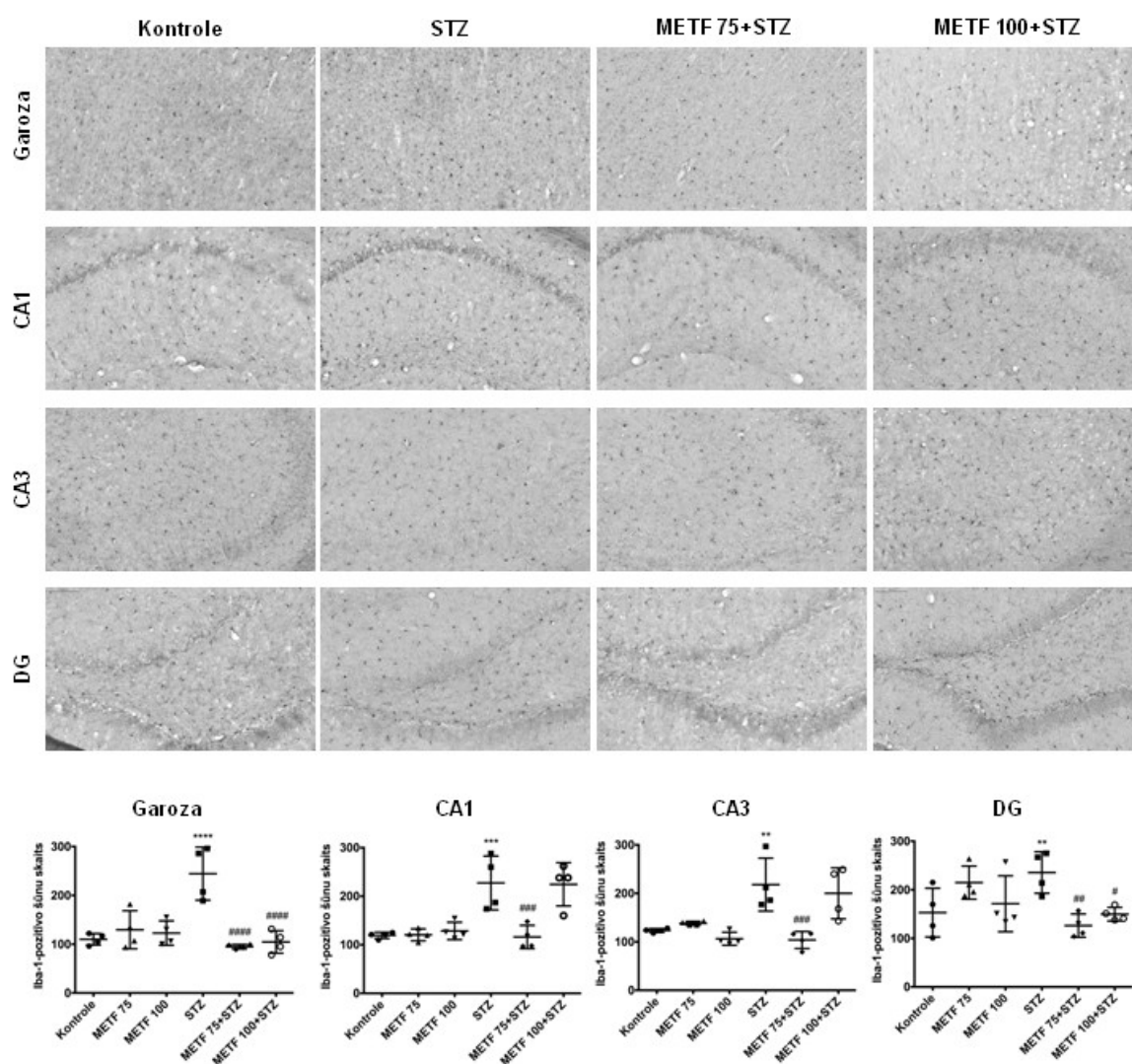
## 2.8. Statistiskā analīze

Visi dati uzrāda kā vismaz divu neatkarīgu eksperimentu vidējās vērtības ± standartnovirzi (S.D.). Imūnhistoķīmiskie un histoķīmiskie dati analizēti, izmantojot vienvirziena ANOVA, kam sekoja Holma-Sidaka post-tests. Statistiskā nozīmība noteikta pie  $P < 0,05$ .

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. Metformīna efekti uz mikrogliozi sAD un veselo žurku smadzenēs

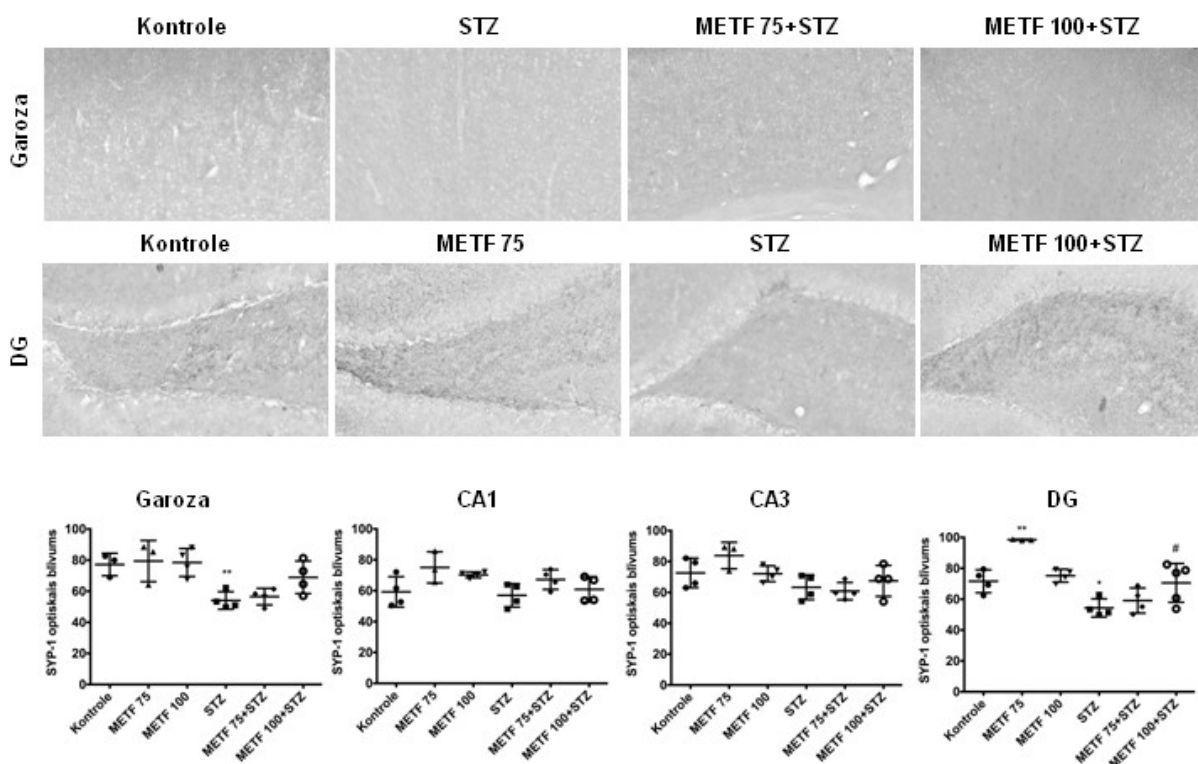
Būtisks Iba-1 pozitīvo šūnu skaita pieaugums tika novērots STZ grupas dzīvnieku garozā ( $P < 0,0001$ ), hipokampa CA1 ( $P < 0,001$ ), CA3 un DG rajonos ( $P < 0,001$ ) salīdzinot ar kontroles grupu. Žurkām no STZ grupas, kas saņēma metformīnu 75 mg/kg devā, novēroja būtisku Iba-1 pozitīvo šūnu skaita samazināšanos garozā ( $P < 0,001$ ), CA1 un CA3 hipokampa rajonos ( $P < 0,0001$ ), kā arī DG rajonā ( $P < 0,01$ ), salīdzinot ar STZ grupu. Salīdzinot ar STZ grupu, žurkām, kurām tika icv ievadīts STZ un kas vēlāk saņēma metformīnu 100 mg/kg devā novēroja būtiski zemāku Iba-1 pozitīvo šūnu skaitu garozā ( $P < 0,0001$ ) un hipokampa DG ( $P < 0,05$ ). Kontroles grupas dzīvniekiem metformīna ievadīšana nav ietekmējusi Iba-1 pozitīvo šūnu skaitu nevienā no pētāmiem smadzeņu rajoniem.



3.1.1.attēls. **Metformīna (METF) efekti uz kontroles un STZ žurku Iba-1-pozitīvo šūnu skaitu.** Reprezentatīvajās mikrofotogrāfijas parādīti rajoni, kuros veikta šūnu skaitīšanas (pie  $200 \times$  palielinājuma). Mērogs bija  $100 \mu\text{m}$ . Vērtības uzrādītas kā vidējās  $\pm$  S.D. ( $n=4$  dzīvnieki grupā).  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$  un  $****P < 0,0001$  pret kontroles grupu;  $\#P < 0,05$ ,  $\#\#P < 0,01$ ,  $\#\#\#P < 0,001$  un  $\#\#\#\#P < 0,0001$  pret STZ grupu.

### 3.2. Metformīna efekti uz sinaptisko blīvumu sAD un veselo žurku smadzenēs

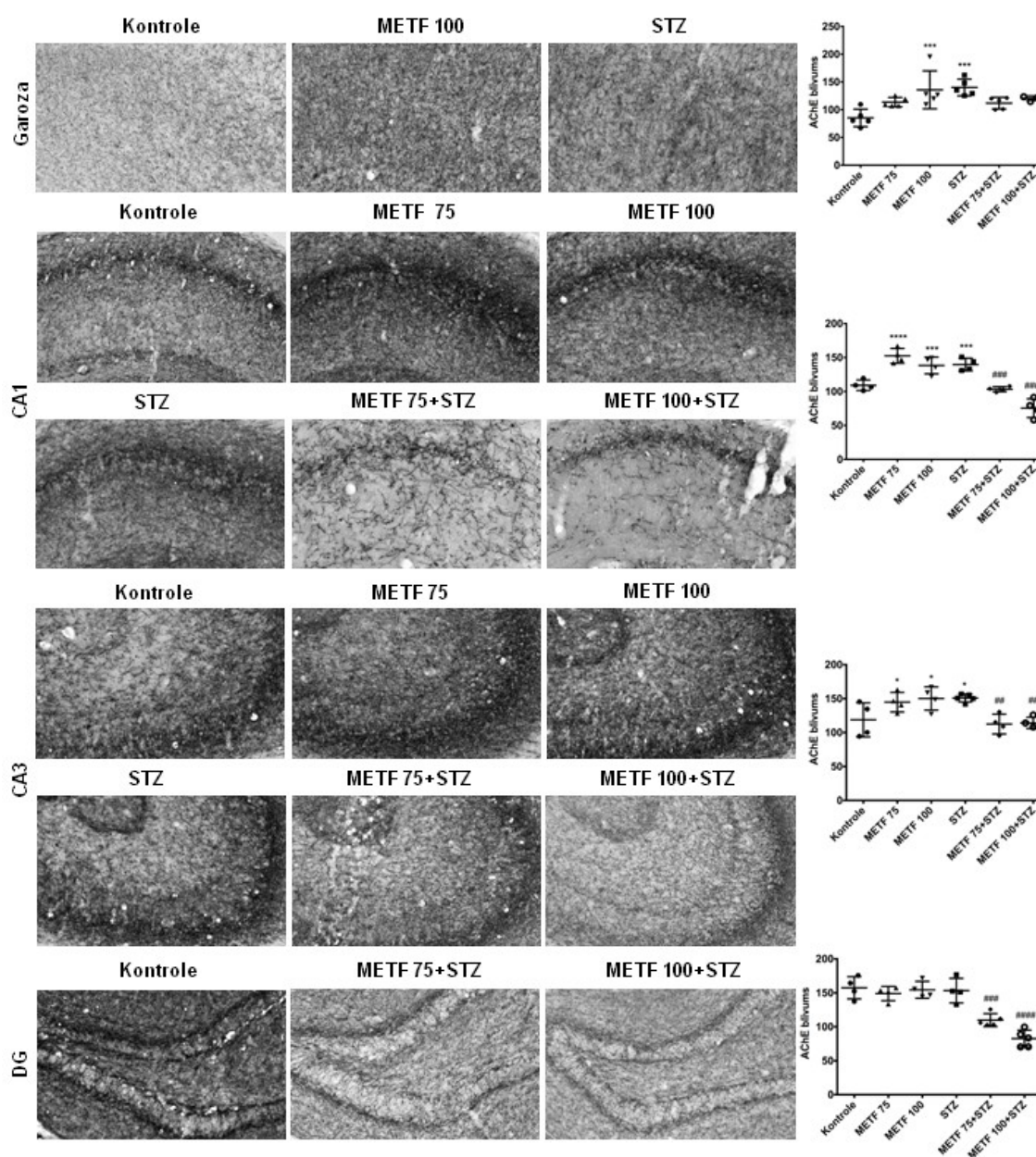
STZ ievadīšana izraisīja būtisku SYP-1 pozitīvo šūnu skaita samazinājumu sAD modeļžurku garozā ( $P < 0,01$ ) un hipokampa DG rajonā ( $P < 0,05$ ) salīdzinot ar kontroles grupu. STZ grupas dzīvniekiem, kuriem ievadīja metformīnu  $100 \text{ mg/kg}$  devā, novēroja būtisku SYP-1 pozitīvo šūnu skaita pieaugumu hipokampā DG rajonā ( $P < 0,05$ ), salīdzinot ar STZ grupu. METF *per se* neietekmēja SYP-1 blīvumu kontroles grupas dzīvniekiem nevienā no pētāmiem smadzeņu rajoniem.



3.2.1.attēls. **Metformīna (METF) efekti uz kontroles un STZ žurku sinaptofizīna (SYP-1) blīvumu.** Reprezentatīvajās mikrofotogrāfijas parāda rajonus, kurās noteikta būtiskās atšķirības pēc šūnu skaitīšanas (pie  $200 \times$  palielinājuma). Mērogs bija  $100 \mu\text{m}$ . Vērtības uzrādītas kā vidējās  $\pm$  S.D. ( $n=4$  dzīvnieki grupā).  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$  un  $****P < 0,0001$  pret kontroles grupu;  $\#P < 0,05$ ,  $\#\#P < 0,01$ ,  $\#\#\#P < 0,001$  un  $\#\#\#\#P < 0,0001$  pret STZ grupu.

### 3.3. Metformīna efekti uz AChE blīvumu sAD un veselo žurku smadzenēs

Dzīvniekiem, kuri icv saņēma STZ injekciju, novēroja būtisku AChE-pozitīvo šūnu skaita pieaugumu garozā un hipokampa CA1 ( $P < 0,001$ ) un CA3 ( $P < 0,05$ ) rajonos salīdzinot ar kontroles grupu. STZ grupas dzīvniekiem, kuriem ievadīja metformīnu 100 mg/kg devā, AChE pozitīvo šūnu skaits bija būtiski samazināts hipokampa CA1 ( $P < 0,001$ ), DG ( $P < 0,0001$ ) un CA3 ( $P < 0,01$ ) rajonos, salīdzinot ar STZ grupu. Līdzīgi rezultāti tika iegūti grupai METF75+STZ. METF *per se* neietekmēja AChE kontroles grupas dzīvniekiem.

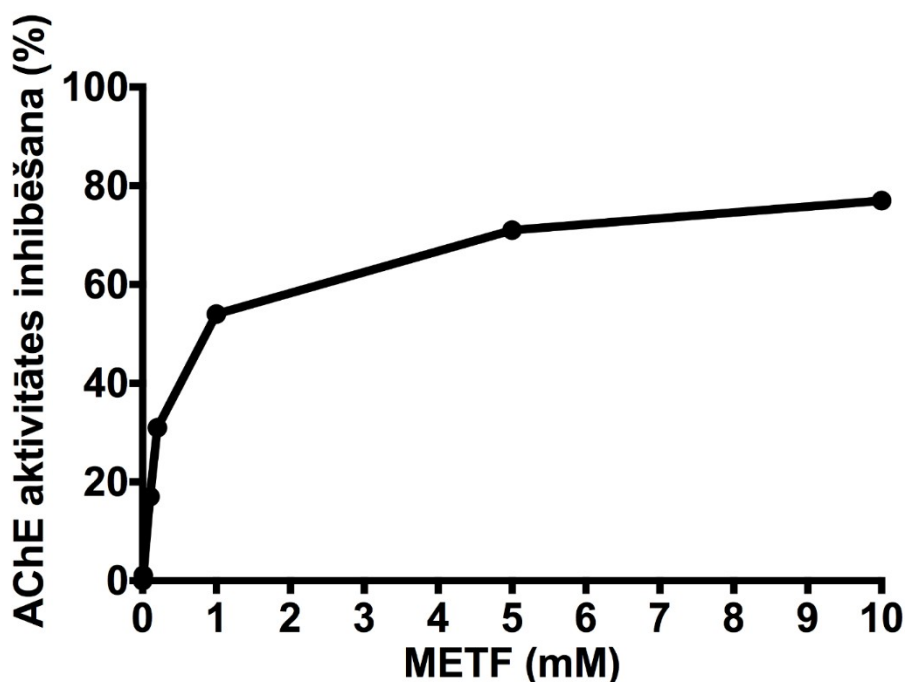


3.3.1.attēls. Metformīna (METF) efekti uz kontroles un STZ žurku acetilholīnesterāzes (AChE) pozitīvo šūnu skaitu. Reprezentatīvās mikrofotogrāfijas parāda rajonus, kurās noteikta būtiskās atšķirības pēc šūnu skaitīšanas (pie  $200 \times$  palielinājuma). Mērogs bija  $100 \mu\text{m}$ . Vērtības uzrādītas kā

vidējās  $\pm$  S.D. (n=4 dzīvnieki grupā). \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  un \*\*\*\* $P < 0,0001$  pret kontroles grupu; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  un #### $P < 0,0001$  pret STZ grupu.

### 3.4. Metformīna efekti uz acetilholīnesterāzes aktivitāti *in vitro*

*In vitro*, metformīns inhibēja acetilholīnesterāzes aktivitāti sekojošajās koncentrācijās: 0,01 mM – par 1,1%, 0,1 mM – par 17%, 0,2 mM – par 31%, 1mM – par 54% ( $IC_{50}$ ), 5mM – par 71% un 10 mM – par 77%. Reference viela – neostigmīna bromīds – arī producēja spēcīgu acetilholīnesterāzes aktivitātes inhibēšanu: 0,001 mM koncentrācijā – par 62%, 0,01 mM – par 76% un par 84% – 0,1 mM koncentrācijā (dati nav parādīti).



3.4.1.attēls. Metformīna (METF) ietekme uz acetilholīnesterāzes (AChE) aktivitātes inhibēšanu.

## 4. DISKUSIJA

Šajā pētījumā pētīja vienu no vecākiem antidiabētiskiem līdzekļiem – metformīna efektus uz neuroiekaisumu un smadzeņu neironālo plasticitāti sporādiskā AD tipa modeļa žurkās, kā arī metformīna spēju inhibēt acetilholīnesterāzes darbību *in vitro*.

Agrīnās izmaiņas pie sAD ir saistītas ar pretiekaisuma šūnu – astrocītu un mikroglijas – palielināto aktivitāti, un tai sekojošu neuroiekaisuma procesa iniciēšanu. Šajā pētījumā sAD modeļžurkām novēroja būtisku mikrogliozi smadzeņu garozas un hipokampa rajonos. Modeļa dzīvnieki, kuriem vadīja metformīnu 75 mg/kg devā, uzrādīja būtiski mazāku mikrogliozes marķiera Iba-1-pozitīvo šūnu skaitu visos pētāmos smadzeņu rajonos, savukārt dzīvniekiem, kuriem metformīns tika ievadīts 100 mg/kg devā, tas mazināja mikrogliozi garozā un hipokampa DG rajonā. Līdzīgie, no devas atkarīgie metformīna efekti novēroti peļu diabēta modelī, ko izraisīja ar STZ ievadīšanu (De Oliveira *et al.*, 2016). Šajā pētījumā metformīnu vadīja 21 dienu 100 mg/kg devā un novēroja mikrogliozes mazināšanos hipokampa DG rajonā (De Oliveira *et al.*, 2016). Kopumā, metformīna pretiekaisuma darbība ir labi dokumentēta diabēta modeļdzīvniekos (Krasnova *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016), bet iepriekš netika apskatīta sAD modeļdzīvniekos. Balstoties uz šī pētījuma datiem, var spriest, ka metformīnam ir pretiekaisuma efekti arī sAD-tipa modelī.

Neuroiekaisums rada traucējumus sAD modeļžurku spējā ģenerēt jaunus neironus un tādējādi izraisa kognitīvos traucējumus (Mishra *et al.*, 2018). Līdz ar to, tika noteikti metformīna efekti uz procesiem, kas ir iesaistīti jauno neironu ģenerēšanā: sinaptisko blīvumu (SYP-1) un holīnērgisko neirotransmisiju (AChE). Būtisks SYP-1 deficīts ir dokumentēts vairākos AD slimnieku smadzeņu rajonos (Mota *et al.*, 2019; Pilipenko *et al.*, 2019). Šī pētījuma rezultāti parāda, ka STZ grupā novēroja būtisku SYP-1 blīvuma samazināšanos, kas varētu veicināt sinaptiskā blīvuma deficīta sAD modeļžurku garozā un hipokampa DG rajonos. Šos deficītus DG rajonā nenovēroja tiem sAD modeļdzīvniekiem, kuriem ievadīja metformīnu 100 mg/kg devā. Ir intriģējoši tas, ka 75 mg/kg devā metformīns *per se* palielināja SYP-1 blīvumu šajā rajonā. Līdz ar to, var secināt, ka metformīns spēj pastiprina sinaptiskos procesus arī veselās žurkās. ACh ir viens no svarīgākajiem neirotransmiteriem, kas ir iesaistīti iemācīšanās, atmiņas un uzmanības procesu nodrošināšanā (Xu *et al.*, 2012). Pie tam, holīnērgiskā sistēma tiešā veidā ietekmē jauno neironu veidošanos (Kotani *et al.*, 2008), un būtiska šīs sistēmas deģenerācija pie AD ir labi aprakstīta vairākos pētījumos. Esošā pētījuma dati demonstrē, ka STZ ievadīšana izraisīja būtisku AChE aktivitātes

paaugstināšanos sAD visos modeļzūru smadzeņu rajonos, izņemot hipokampa DG. Metformīns normalizēja AChE aktivitāti sAD modeļzūru hipokampa CA1 un CA3 rajonos. Pie tam, metformīns bija samazinājis AChE aktivitāti sAD modeļzūru DG rajonā. Savukārt *in vitro* tika novērota metformīna inhibitora aktivitāte uz AChE aktivitāti ( $IC_{50}$  pie 1 mM), kas atbilda citam pētījumam, kur metformīns mazināja AChE aktivitāti diabēta modeļzūrkās (Saliu *et al.*, 2016).

## 5. SECINĀJUMI

1. Metformīna ievadīšana sAD modeļžurkām mazina mikrogliozī, sinaptiskā blīvuma deficītu un AChE pārmērīgu aktivitāti šo dzīvnieku smadzeņu garozā un hipokampā;
2. *In vitro*, metformīns inhibē AChE aktivitāti, uzrādot IC<sub>50</sub> 1mM koncentrācijā, norādot uz tā spēju regulēt ACh daudzumu;
3. Metformīna neiroprotektīvie efekti sAD modeļžurkās ir saistīti ar to centrāliem pretiekaisuma efektiem, sinaptiskā blīvuma nodrošināšanu un acetilholīna daudzuma uzturēšanu šo dzīvnieku smadzeņu garozā un hipokampā;
4. Nepieciešami tālākie pētījumi, lai uzzinātu visu metformīna neiroprotektīva potenciāla klāstu sAD-tipa modelī.

## **PATEICĪBAS**

Vēlos izteikt vislielāko pateicību darba vadītājam Dr. med. Vladimiram Piļipenko par maģistra darba pētījuma izstrādes gaitā sniegto palīdzību, padomiem un ierosinājumiem, atsaucību, veltīto laiku, par pieredzi un unikālo praksi, ko ieguvu pētījuma eksperimentālajā daļā.

Vēlos izteikt lielāko pateicību Msc. pharm. Karīnai Narbutei par palīdzību pētījuma eksperimentālajā daļā imunohistoķīmiskās analīzes veikšanā un sniegto palīdzību darba izstrādē un padomiem.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Ahmed, M. et al.** Structural conversion of neurotoxic amyloid-B 1-42 oligomers to fibrils. *Nature Structural and Molecular Biology* (2010), doi:10.1038/nsmb.1799.
2. **Allinson, T. M. J., Parkin, E. T., Turner, A. J. & Hooper, N. M.** ADAMs Family Members As Amyloid Precursor Protein  $\alpha$ -Secretases *Journal of Neuroscience Research* (2003), doi:10.1002/jnr.10737.
3. **Allsop D., Mayes J.** Amyloid  $\beta$  – peptide and Alzheimer’s disease. *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (2014), 56(1): 99-110.
4. **Alzheimer’s association.** Beta-amyloid and the amyloid hypothesis. (2019), Pieejams tiešsaistē: [https://www.alz.org/national/documents/topicsheet\_betaamyloid.pdf], skatīts [03.10.19].
5. **Antibodypedia.** Immunohistochemistry. (2014), Pieejams tiešsaistē: [https://www.antibodypedia.com/text/text\_methods.php?text=method\_ihc], skatīts [11.11.19].
6. **Arendt T., Stieler JT., Holzer M.** Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin* (2016), 126(3): 238-292.
7. **Bali J., Hashemi G., Zurbriggen S., Rajendran L.** Role of genes linked to sporadic Alzheimer’s disease risk in the production of  $\beta$ -amyloid peptides. *Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics* (2012), 109 (38) 15307-15311.
8. **Ballatore, C., Lee, V. M.-Y. & Trojanowski, J. Q.** Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer’s disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience* (2007), **8**: 663–72.
9. **Bao J., Yacoubou A., Mahaman R., Rong L., Wang J.Z., Zhang Z., Zhang B., Xiaochuan W.** Sex differences in the cognitive and hippocampal effects of Streptozotocin in an Animal Model of Sporadic AD. *Frontiers in aging Neuroscience* (2017), doi:10.3389/fnagi.2017.00347.
10. **Barber R.C.** The genetics of Alzheimer’s disease. *Scientifica Journal* (2012), doi.org/10.6064/2012/246210.

11. **Bezard E., Yue Z., Kirik D., Spillantini M. G.** Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Movement Disorders* (2013), 28 (1), 61–70
12. **Bloom GS.** Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (2014), 71(4): 505-508.
13. **Bodmer M., Meier CR., Jick SS., Imfeld P.** Metformin, other antidiabetic drugs, and risk of Alzheimer's disease: a population-based case-control study. *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (2012), 60(5): 916-921.
14. **Calsolaro V., Edison P.** Alterations in Glucose Metabolism in Alzheimer's disease. *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (2016), 10(1): 31-39.
15. **Cherry, J. D., Olschowka, J. A., O'Banion, M.** Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation* (2014),11(1): 98.
16. **Crous-Bou M., Minguillon C., Gramunt N., Molinuevo JL.** Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimer's Research & Therapy* (2017), 9(1): 71.
17. **Dal Pra I., Armato U., Chiarini A.** Astrocytes' Role in Alzheimer's Disease Neurodegeneration. *Physiology and Pathology* (2017), doi:10.5772/intechopen.72974.
18. **Dehkordi AH., Abbaszadeh A., Mir S., Hasanvand A.** Metformin and its anti-inflammatory and anti-oxidative effects; new concepts. *Journal of Renal Injury Prevention* (2019), doi: 10.15171/jrip.2019.11.
19. **Dong S., Duan Y.** Advances in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Focusing on Tau-Mediated Neurodegeneration. *Translational neurodegeneration* (2012), 1(1): 24.
20. **Dorszewska J., Predecki M, Oczkowska A., Dezor M., Kozubski W.** Molecular basis of Familial and Sporadic Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research.* (2016), doi:10.2174/1567205013666160314150501.
21. **DrugBank.** Metformin. *DrugBank* (2020). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00331>], skatīts: [24.01.2020].

22. **Edwards GA., Gamez N., Escobedo Jr. G., Calderon O., Moreno-Gonzalez I.** Modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* (2019), doi.org/10.3389/fnagi.2019.00146.
23. **Ellis M.E., Higuera V.** What are the stages of Alzheimer's disease. *Healthline* (2016). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.healthline.com/health/stages-progression-alzheimers>], skatīts [20.01.2020].
24. **Ellison J.** Tau protein and Alzheimer's disease: what's the connection. *Bright Focus Foundation* (2019). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.brightfocus.org/alzheimers-disease/article/tau-protein-and-alzheimers-disease-whats-connection>], skatīts [29.09.19].
25. **Farr SA., Roesler E., Niehoff ML., Roby DA., Mckee A., Morley JE.** Metformin Improves Learning and Memory in the SAMP8 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* (2019), 68(4): 1699-1710.
26. **Frisoni G.** Clinical validity of CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* (2016), 15(7): 650-651.
27. **Gao Y.L., Wang N., Sun F.R., Cao X.P., Zhang W., Yu J.T.** Tau in neurodegenerative disease. *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (2018), 6(10): 175.
28. **García-Ayllón MS, Small DH, Avila J, Sáez-Valero J.** Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and  $\beta$ -Amyloid. *Frontiers in Molecular Neuroscience* (2011), doi:10.3389/fnmol.2011.00022.
29. **Gibson GE, Shi Q.** A mitocentric view of Alzheimer's disease suggests multifaceted treatments. *Journal Alzheimer's Disease* (2010), 20(2): 591–607.
30. **Gonzales-Reyes RE., Nava-Mesa MO., Mora-Munoz L.** Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Frontiers in Molecular Neuroscience* (2017), doi:10.3389/fnmol.2017.00427.
31. **Grieb P.** Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology* (2016), 53(3): 1741-1752.
32. **Grossberg G., Tong G., Burke A., Tariot P.** Present Algorithms and Future Treatments for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease*. (2019), 67(4): 1157-1171.

33. **Gudreniece A., Paegle I., Karelis G., Minibajeva O., Gulbe G., Kalniņa Z.** Alcheimera slimības, vaskulāras demences, Levi ķermenīšu demences un frontotemporālās demences klīniskās vadlīnijas. *Latvijas Neurodeģeneratīvo slimību asociācija*. (2017). Pieejams tiešsaistē: [<https://spkc.gov.lv/uploads/files/59df1724400d4.pdf>], skatīts: [26.03.2020].
34. **Gžibovska A.** Metformīna efekti uz uzvedību un glikozes homeostāzes traucējumiem Alcheimera slimības tipa modeļdzīvniekos. *Latvijas Universitātes datu bāze*. (2019). Pieejams tiešsaistē: [<https://dspace.lu.lv/dspace/handle/7/47823>], skatīts [20.03.20].
35. **Haam J., Yakel J.L.** Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *Journal of neurochemistry* (2017), 142(2): 111-121.
36. **Haass, C. & Mandelkow, E.** Fyn-tau-amyloid: a toxic triad. *Cell* (2010), **142**: 356–8.
37. **Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S.** Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (2012), doi:10.1101/cshperspect.a006270.
38. **Hemonnot A.L., Hua J., Ulmann L., Hirbec H.** Microglia in Alzheimer Disease: Well-Know Targets and New Opportunities. *Aging Neurosci Journal* (2019), doi.org/10.3389/fnagi.2019.00233.
39. **Heneka MT., Carson MJ., Landreth GE et al.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* (2015), 14(4): 388-405.
40. **Hereema E.** Shrinking Hippocampus and Alzheimer's Disease. *Verywell Health* (2020). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.verywellhealth.com/what-is-the-hippocampus-p2-98810>], skatīts: [14.03.2020].
41. **Hereema E.** What Is Alzheimer's Disease? *Verywell Health* (2020). Pieejams tiešsaistē:[<https://www.verywellhealth.com/alzheimers-overview4014762#treatment>], skatīts: [24.03.2020].
42. **Huang Y.C., Hsu C.C., Lin W.C., Yin T.K., Huang C.W., Wang P.W., Chang H.H., Chiu N.T.** Effects of Metformin on the Cerebral Metabolic Changes in Type 2 Diabetic Patients. *The Scientific World Journal* (2014), doi.org/10.1155/2014/694326.
43. **Kamat PK.** Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural regeneration research*. (2015), 10(7): 1050-1052.

44. **Keskin AO., Durmaz N., Uncu G., Erzurumluoglu E., Yildirim Z., Tuncer N., Adapinar DO.** Future treatment of Alzheimer's disease. *Geriatric Medicine and Gerontology*. (2019), doi: 10.5772/intechopen.85096.
45. **Kickstein E., Krauss S., Thornhill P., Rutschow D., Zeller R., Sharkey J., Williamson R., Fuchs M., Kohler A., Glossmann H., Schneider R., Sutherland C. and Schweigner S.** Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *PNAS* (2018), doi:10.1073/pnas.0912793107.
46. **Kocahan S., Zumrut D.** Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*. (2017), 15(1): 1-8.
47. **Kolos YA., Grigoriyev IP., Korzhevskiy DE.** A synaptic marker synaptophysin. *Morfologija*. (2015), 147(1): 78-82.
48. **Kotani, S., Yamauchi, T., Teramoto, T., Ogura, H.** Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, enhances adult hippocampal neurogenesis. *Chemico-Biological Interactions* (2008), 175(1): 227–230. doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.004.
49. **Krasnova, I.N., Justinova, Z., Cadet, J.L.** Methamphetamine addiction: involvement of CREB and neuroinflammatory signaling pathways. *Psychopharmacology (Berl)*. (2016), 233(1): 1945–1962. doi.org/10.1007/s00213-016-4235-8.
50. **Langbaum J., Chen K., Caselli J.R.** Hypometabolism in Alzheimer-Affected Brain Regions in Cognitively Healthy Latino Individuals Carrying the Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 Allele. *Arch Neurology* (2010), 67(4):462-468.
51. **Laube I.** Metformīna ietekme uz Alcheimera slimības modeļa žurku sociālo uzvedību. *Latvijas Universitātes datu bāze* (2019). Pieejams tiešsaistē: [<https://dspace.lu.lv/dspace/handle/7/48701>], skatīts [11.04.20].
52. **Legg T.J.** A Brief History of Alzheimer's Disease. *Healthline* (2016), Pieejams tiešsaistē: [<https://www.healthline.com/health/alzheimers-history>], skatīts: [07.03.2020].
53. **Li, Y., Tan MS., Jiang, T., Tan L.** Microglia in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* (2014), doi:10.1155/2014/437483.

54. **Llorens-Martin M.** Exercising New Neurons to Vanquish Alzheimer Disease. *Brain Plasticity* (2018), 4(1): 111-126.
55. **Maccioni R. B., Rojo L. E., Fernandez J. A., Kuljis R. O.** The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2009), doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03972.x.
56. **MacGill M.** What to know about Alzheimer's disease? *Medical News Today* (2018). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.medicalnewstoday.com/articles/159442>], skatīts: [24.03.2020].
57. **Martin, L., Latypova, X. & Terro, F.** Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* (2011), **58**: 458–471.
58. **Mayeux R., Stern Y.** Epidemiology of Alzheimer Disease. *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (2012), 2(8): a006239.
59. **Mayo Clinic Staff.** Alzheimer's Disease. *Mayo Clinic*. (2018), Pieejams tiešsaistē: [<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/diagnosis-treatment/drc-20350453>], skatīts: [07.03.2020].
60. **Mielke M.** Gender Differences in Alzheimer's disease Dementia. *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (2018),35(11): 14-17.
61. **Mishra, S.K., Singh, S., Shukla, S., Shukla, R.** Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. *Neurochemistry International* (2018), 113(1): 56–68. doi.org/10.1016/j.neuint.2017.11.012.
62. **Mosconi L., Pupi A., De Leon M.** Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *National Institutes of Health* (2008), doi:10.1196/annals.1427.007.
63. **Mota, C., Taipa, R., das Neves, S.P., Monteiro-Martins, S., Monteiro, S., Palha, J.A., Sousa, N., Sousa, J.C., Cerqueira, J.J.** Structural and molecular correlates of cognitive aging in the rat. *Scientific Reports* (2019), 9(1): 1–14. doi.org/10.1038/s41598-019-39645-w.
64. **Mufson EJ., Mahady L., Waters D., Counts SE., Perez SE., DeKosky S., Ginsberg SD., Ikonovic MD., Scheff S., Brinder L.** Hippocampal Plasticity During the Progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience Journal* (2015), 309(1): 51-67.

65. **Murphy M.P., LeVine H.** Alzheimer's disease and the  $\beta$  – Amyloid Peptide. *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (2010), 19(1): 311.
66. **Murray, M. E. et al.** Clinicopathologic and 11C-Pittsburgh compound B implications of Thal amyloid phase across the Alzheimer's disease spectrum. *Brain* (2015), 138: 1370–81.
67. **Nierenberg C.** Alzheimer's Disease: Brain Changes, Symptoms and Treatment. *Live Science*. (2019). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.livescience.com/65748-alzheimers-disease.html>], skatīts: [24.03.2020].
68. **Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C. J. & Lovestone, S.** The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Frontiers Neurology* (2013), 4: 1–11.
69. **Oliveira WH., Nunes AK., Franca MER., Santos LA., Los DB., Rocha SW., Barbosa KP., Rodriguez GB., Peixoto CA.** Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Research*. (2016), doi: 10.1016/j.brainres.2016.05.013.
70. **Paddock C.** New approach may save brain cells in neurodegenerative diseases. *Medical News Today* (2019). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.medicalnewstoday.com/articles/326477>], skatīts: [23.03.2020].
71. **Passamonti L., Tsvetanov K.A., Jones P.S., Arnold R., Bevan-Jones W.R., Borchert R.J., Mak E., Su L., O'Brien J.T. and Rowe J.B.** Neuroinflammation and Functional Connectivity in Alzheimer's Disease: Interactive Influences on Cognitive Performance. *Journal of Neuroscience* (2019), 39 (36) 7218-7226.
72. **Pilipenko, V., Narbute, K., Pupure, J., Rumaks, J., Jansone, B., Klusa, V.** Neuroprotective action of diazepam at very low and moderate doses in Alzheimer's disease model rats. *Neuropharmacology* (2019), 144(1): 319–326. doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.003.
73. **Pratt E.** Why does Alzheimer's pose a greater risk for women than men. *Healthline* (2019). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.healthline.com/health-news/are-women-more-likely-to-get-alzheimers-than-men>], skatīts [27.09.19].
74. **Ravelli KG., Rosario BD., Camarini R., Hernandez MS., Britto LR.** Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. *Neurotoxicity Research* (2017), 31(3): 327-333.

75. **Rodriguez L., Mathiaz T.** Effectiveness of planned teaching program on knowledge regarding Alzheimer's disease among the family members of elderly in a selected urban community at Mangalore. *Indian Journal of Psychiatry* (2016), 58(1): 44-48.
76. **Rotermund C., Machetanz G., Fitzgerald J.C.** The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Disease. *Frontiers in Endocrinology* (2018), doi: 10.3389/fendo.2018.00400.
77. **Saisho Y.** Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* (2015), doi: 10.2174/1871530315666150316124019.
78. **Saliu, J.A., Oboh, G., Omojokun, O.S., Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R., Guterries, J., Stefanello, N., Carvalho, F., Schmatz, R., Morsch, V.M., Boligon, A.** Effect of dietary supplementation of Padauk (*Pterocarpus soyauxii*) leaf on high fat diet/streptozotocin induced diabetes in rats' brain and platelets. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (2016), 84(1): 1194–1201. doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.043.
79. **Sarazin M., Michon A., Pillon B., Samson Y., Canuto A., Gold G.** Metabolic correlates of behavioral and affective disturbances in frontal lobe pathologies. *Journal of Neurology* (2003), 250 (7), 827–833.
80. **Shojaeian S., Maslehat N., Zarnani A.H.** Detection Systems in Immunohistochemistry. *Online First* (2018), doi: 10.5772/intechopen.82072.
81. **Skaper SD, Facci L., Zusso M., Giusti P.** Synaptic Plasticity, Dementia and Alzheimer Disease. *CNS & Neurological Disorders Journal* (2017), doi :10.2174/1871527316666170113120853.
82. **Slimību profilakses un kontroles centrs (SPKC).** Statistikas dati par psihisko veselību 2009. – 2017. *Statistikas dati. Psihiskā veselība*. Pieejams tiešsaistē: [<https://www.spkc.gov.lv/lv/statistika-un-petijumi/statistika/veselibas-aprupesstatistika1>], skatīts [24.09.19].
83. **Son SM., Shin HJ., Byun J., Kook SY., Moon M., Chang YJ., Mook-Jung I.** Metformin Facilitates Amyloid- $\beta$  Generation by  $\beta$ - and  $\gamma$ -Secretases via Autophagy Activation. *Journal Alzheimer's disease* (2016), 51(4): 1197-1208.
84. **Sukel K.** Figuring out why Alzheimer's disease strikes more women than men. *Brain Facts* (2018). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.brainfacts.org/diseases-and-disorders/topic-center-alzheimers-and-dementia/figuring-out-why-alzheimers-disease-strikes-more-women-than-men-1115183>], skatīts [27.09.19].

85. **Vingtdeux, V., Sergeant, N. & Buée, L.** Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology* (2012), 3: 229.
86. **Wang J., Gallagher D., DeVito L., Cancino G., Tsui D., He L., Keller GM., Frankland PF., Kaplan DR, Miller FD.** Metformin Activates an Atypical PKC-CBP Pathway to Promote Neurogenesis and Enhance Spatial Memory Formation. *Cell Stem Cell* (2012), 11(1): 23-35.
87. **Wang, C., Liu, C., Gao, K., Zhao, H., Zhou, Z., Shen, Z., Guo, Y., Li, Z., Yao, T., Mei, X.** Metformin preconditioning provide neuroprotection through enhancement of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis after spinal cord injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016), 477(1): 534–540. doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.148.
88. **Wegerer J.** How Alzheimer's Evolves from early to late stages. *Alzheimers blog* (2018). Pieejams tiešsaistē: [<https://www.alzheimers.net/2014-04-10/how-alzheimers-evolves/>], skatīts [18.01.20].
89. **Wenjun L., Chaudhari K., Yang S.H.** Metformin Alters Locomotor and Cognitive Function and Brain Metabolism in Normoglycemic Mice. *Aging and disease* (2019), 10(5): 949-963.
90. **Xu W.,Ferrari C., Wang H.X.** Epidemiology of Alzheimer's disease. *IntechOpen* (2013), doi: 10.5772/54398.
91. **Xu, Y., Yan, J., Zhou, P., Li, J., Gao, H., Xia, Y., Wang, Q.** Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology.* (2012), 97(1): 1–13. doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.02.002.
92. **Zilberter Y. and Zilberter M.** The vicious circle of hypometabolism in neurodegenerative diseases: ways and mechanisms of metabolic correction. *Journal of Neuroscience Research* (2017), 95:2217–2235.

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs "Metformīna efekti uz mikrogliozi, holīnērgisko neurotransmisiju un sinapšu blīvumu pie sporādiskas Alcheimera slimības tipa patoloģijas" izstrādāts LU Medicīnas fakultātēs Farmakoloģijas katedras laboratorijā.


Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Jeļizaveta Jeva Bulinska

 11.05.2020

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Pētnieks Vladimirs Pilipenko, Dr. med.

 11.05.2020

Recenzents: Profesore, Dr. habil. med. Ruta Muceniece

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē \_\_\_\_\_

(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule \_\_\_\_\_

(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistratūra gala pārbaudījuma komisijas sēdē \_\_\_\_\_ 2020., prot. Nr. \_\_\_\_\_.

Komisijas sekretāre: \_\_\_\_\_

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)